

**HERSTELLUNG UND CHARAKTERISIERUNG
MONOKLONALER ANTIKÖRPER
GEGEN
DIE TRICHOHECENE T-2 TOXIN UND RORIDIN A
UND DEREN ANWENDUNG
BEI EXPERIMENTELLEN INTOXIKATIONEN**

Rüdiger Hack

Disbui. Hack

1988



Aus dem Institut für Hygiene und Technologie
der Lebensmittel tierischen Ursprungs
(Lehrstuhl: Prof. Dr. G. Terplan)
der Tierärztlichen Fakultät der Universität München

Herstellung und Charakterisierung monoklonaler Antikörper
gegen die Trichothecene T-2 Toxin und Roridin A
und deren Anwendung bei experimentellen Intoxikationen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Rüdiger Hack
aus
Neustädtles

München 1988

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Prof. Dr. M. Rüsse

Referent: Prof. Dr. G. Terplan

Korreferent: Prof. Dr. A. Schmid

Tag der Promotion: 29. Juli 1988

Meinem Vater

und

meiner Frau



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1.	Einleitung 1
2.	Schrifttum 2
2.1	Trichothecene 2
2.1.1	T-2 Toxin 6
2.1.1.1	Metabolismus 7
2.1.1.2	Immunologische Nachweisverfahren 11
2.1.2	Roridin A 12
2.1.2.1	Vorkommen und Toxizität 14
2.1.2.2	Immunologische Nachweisverfahren 15
2.2	Monoklonale Antikörper 16
2.2.1	Allgemeines zur Hybridomtechnologie 16
2.2.2	Monoklonale Antikörper gegen Trichothecene 23
2.2.3	Passive Immunisierung mit monoklonalen Antikörpern gegen Trichothecene 26
3.	Eigene Untersuchungen 27
3.1	Herstellung und Charakterisierung monoklonaler Antikörper gegen T-2 Toxin 27
3.1.1	Material 27
3.1.2	Methodik 29
3.1.2	Immunisierung der Mäuse 29
3.1.2.1	Zellkulturbedingungen und Fusion 31
3.1.2.2	Nachweis antikörperproduzierender Hybridome 35
3.1.2.3	Klonierung 36
3.1.2.5	Charakterisierung des Antikörpers 36
3.1.2.5.1	Feststellung der Immunglobulin-subklasse 36
3.1.2.5.2	Ermittlung der Standardkurve 37
3.1.2.5.3	Ermittlung der Spezifität 39
3.1.2.5.4	Verwendung von T-2-HRP anstelle von HT-2-HRP 39
3.1.2.6	Produktion von Ascites 41
3.1.2.7	Charakterisierung des Serums der Maus, deren Milzzellen zum Hybridom 1C4 fusioniert wurden 41
3.1.3	Ergebnisse 42

3.2	Herstellung und Charakterisierung monoklonaler Antikörper gegen Roridin A	53
3.2.1	Material	53
3.2.2	Methodik	54
3.2.2.1	Immunisierung der Mäuse	54
3.2.2.2	Zellkulturbedingungen und Fusion	54
3.2.2.3	Nachweis antikörperproduzierender Hybridome	55
3.2.2.4	Klonierung	56
3.2.2.5	Charakterisierung der Antikörper	56
3.2.2.5.1	Feststellung der Immunglobulinklassen und -subklassen	57
3.2.2.5.2	Ermittlung der Standardkurven	57
3.2.2.5.3	Ermittlung der Spezifität	58
3.2.2.5.4	Bestimmung der Affinitätskonstanten	58
3.2.2.6	Produktion von Ascites	60
3.2.2.7	Charakterisierung der Seren der Mäuse, deren Milzzellen zu den Hybridomen 4H10, 5G11 und 3E1 fusioniert wurden	61
3.2.3	Ergebnisse	61
3.3	Anwendung monoklonaler Antikörper gegen experimentelle Intoxikationen	77
3.3.1	Passive Immunisierung gegen T-2 Toxin bei oraler Toxinbelastung	77
3.3.1.1	Material	77
3.3.1.2	Methodik	81
3.3.1.2.1	Kinetik des monoklonalen anti-T-2 Toxin Antikörpers 1C4 nach parenteraler Applikation	81
3.3.1.2.2	Passive Immunisierung	81
3.3.1.2.2.1	Intravenöse Antikörperapplikation und orale Intoxikation	81
3.3.1.2.2.2	Intraperitoneale Antikörperapplikation und orale Intoxikation	81
3.3.1.3	Ergebnisse	82

III

3.3.2	Passive Immunisierung gegen Roridin A bei oraler Toxinbelastung	87
3.3.2.1	Material	88
3.3.2.2	Methodik	88
3.3.2.2.1	Kinetik des monoklonalen anti-Roridin A Antikörpers 5G11 nach parenteraler Applikation	88
3.3.2.2.2	Passive Immunisierung	88
3.3.2.2.2.1	Intravenöse Antikörperapplikation vor oraler Intoxikation	88
3.3.2.2.2.2	Intravenöse Antikörperapplikation nach oraler Intoxikation	89
3.3.3	Ergebnisse	89
4.	Besprechung der Ergebnisse und Diskussion	95
5.	Zusammenfassung/Summary	116
6.	Literaturverzeichnis	120

1. Einleitung

Da die Aufnahme von Mykotoxinen über die Nahrung - entweder durch unmittelbar mit toxinbildenden Pilzen kontaminierte Nahrungsmittel oder mit durch "carry-over" aus dem Futter belasteten Lebensmitteln tierischen Ursprungs - ein gesundheitliches Risiko für den Verbraucher darstellt, wurden am Lehrstuhl seit längerem Bestrebungen unternommen, diese Substanzen mittels immunologischer Verfahren in Nahrungs- bzw. Futtermittel nachzuweisen (BIERMANN und TERPLAN, 1980; MÄRTLBAUER und TERPLAN, 1985). In letzter Zeit bilden die Trichothecene einen Forschungsschwerpunkt, wobei für T-2 Toxin (ESGIN, 1987), Diacetoxyscirpenol (KLAFER et al., 1988) und Roridin A (MÄRTLBAUER et al., 1988) direkte Enzymimmunoassays (EIAs) erstellt wurden.

Die Nachteile der verwendeten polyklonalen Antiseren (heterogene Antikörperfraktion, trotz guter Spezifität für ein Epitop; Existenz von Antikörpern gegen andere Epitope; mangelnde Reproduzierbarkeit von Entnahme zu Entnahme und von Individuum zu Individuum; unterschiedliche Serumtitern) haben allerdings eine Standardisierung der immunologischen Nachweise erschwert, so daß angestrebt wurde, durch die Entwicklung monoklonaler Antikörper diese Probleme zu lösen.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, monoklonale Antikörper gegen die Trichothecene T-2 Toxin und Roridin A herzustellen und diese auf ihre Eignung zum Nachweis der Toxine zu untersuchen. Außerdem sollte geprüft werden, ob durch die parenterale Applikation dieser monoklonalen Antikörper eine Möglichkeit zur Prophylaxe oder Therapie von experimentellen oralen Intoxikationen besteht.

2. Schrifttum

2.1 Trichothecene

Trichothecene sind sekundäre Stoffwechselprodukte von Fungi imperfecti der Gattungen *Fusarium*, *Stachybotrys*, *Myrothecium*, *Trichothecium*, *Trichoderma*, *Cephalosporium*, *Verticillium* und *Cylindrocarpum* (BAMBURG, 1983). Ihr Name leitet sich ab von "Trichothecin", einer antimykotisch wirksamen Substanz, die von FREEMAN und MORRISON (1948) aus Kulturfiltrat von *Trichothecium roseum* LINK isoliert wurde. Sie sind chemisch charakterisiert als Sesquiterpenoide mit einem trizyklischen Trichothecan-Gerüst, einer Doppelbindung zwischen dem C-9 und C-10 Atom sowie einer Epoxygruppe bei C-12,13 und werden deshalb auch als 12,13 Epoxytrichothec-9-ene bezeichnet.

UENO (1977) teilte die Trichothecene auf Grund ihrer chemischen Struktur in vier Gruppen ein (Abb. 1):

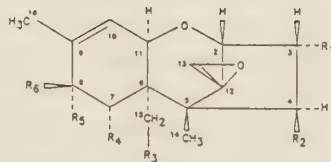
- A Trichothecene mit Hydroxylgruppen und Karbonsäuren als Substituenten;
- B Trichothecene, die sich vom Typ A durch eine Ketogruppe am C-8 Atom unterscheiden;
- C Trichothecene mit einer zweiten Epoxygruppe zwischen C-7 und C-8;
- D Trichothecene mit einem makrozyklischen Ring zwischen C-4 und C-15.

BAMBURG (1983), der ähnlich wie SNYDER (1986) die makrozyklischen Trichothecene der Gruppe C und die 7,8 Epoxytrichothecene der Gruppe D zuordnete, führte noch eine fünfte Gruppe ein (Abb. 1):

- E Trichothecadiene; Trichothecene mit einer Doppelbindung zwischen C-12 und C-13 anstelle der 12,13 Epoxygruppe, die aber sonst einer der Gruppen A-D zugeordnet werden könnten. Sie werden auch als deepoxydierte Trichothecene bezeichnet.

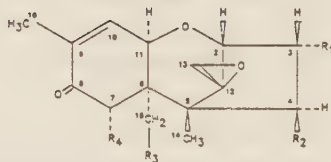
Typ A

	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆
T-2 Toxin	OH	OAc	OAc	H	OIsv	H
HT-2	OH	OH	OAc	H	OIsv	H
DAS	OH	OAc	OAc	H	H	H
Neosolaniol	OH	OAc	OAc	H	OH	H



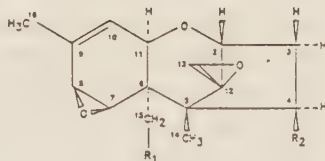
Typ B

	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
Trichothecin	H	OOCCH=CHCH ₃	H	H
Nivalenol	OH	OH	OH	OH
Deoxynivalenol	OH	H	OH	OH
Fusarenon X	OH	OAc	OH	OH

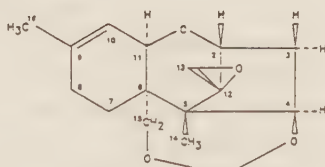
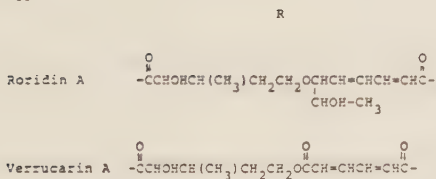


Typ C

	R ₁	R ₂
Crotocotol	H	OH
Crotocotol	H	OOCCH=CHCH ₃



Typ D



Typ E

hier: deepoxidierter Typ A

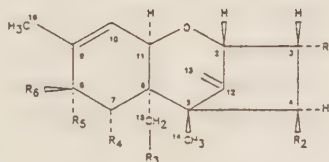
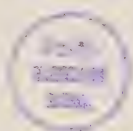


Abbildung 1: Einteilung der Trichothecene in Ahnlehnung an UENO (1977) und - bezüglich Typ E - BAMBURG (1983)

Wenn man die Gruppen nach ihrer akuten Toxizität ordnet, sind die makrozyklischen Trichothecene der Gruppe D am giftigsten, gefolgt von Toxinen der Gruppe A, B und C (UENO, 1977); Trichothecadiene haben kaum eine toxische Wirkung (SWANSON et al., 1987).

Die Trichothecene haben unabhängig von ihrer Zugehörigkeit zu den verschiedenen Gruppen zahlreiche Intoxikationen durch Aufnahme verschimmelter Agrarprodukte verursacht; bei einigen Krankheiten wird zumindest eine Mitbeteiligung angenommen (BAMBURG, 1983). Die wesentlichen Angaben sind in Tab. 1 zusammengefaßt.

Die toxische Wirkung der Trichothecene (Zytotoxizität, Hauttoxizität, Störungen im Immungeschehen, radiomimetischer Effekt und letale Toxizität bei Tieren) (UENO, 1983) sind eng verbunden mit ihrer Wirkung im subzellulären Bereich: Durch Anlagerung an das katalytische Zentrum des Enzyms Peptidyltransferase auf den 60 S Untereinheiten der 80 S Ribosomen (CARRASCO et al., 1973), kommt es zu Störungen der Proteinbiosynthese.

Auf Grund der Einwirkung auf verschiedene Phasen der Proteinbiosynthese können die Trichothecene in zwei Gruppen eingeteilt werden (SNYDER, 1986):

- a) Hemmer der Initiationsphase: diese Trichothecene sind an R_1 und R_3 substituiert (z.B. T-2 Toxin, Roridin A, Verrucarin A).
- b) Hemmer der Elongationsphase bzw. Terminationsphase; diese Trichothecene sind am R_2 substituiert (z.B. Verrucarol).

Für die biologische Aktivität ist die Anwesenheit der 12,13 Epoxidgruppe nötig; eine Spaltung dieses Ringes durch Chemikalien (BAMBURG und STRONG, 1971) oder durch Mikroorganismen (SWANSON et al., 1987) hat einen Verlust der Toxizität zur Folge. Eine Reduktion der Doppelbindung zwischen C-9 und C-10 vermindert die Toxizität um 75% bis 80% (BAMBURG und STRONG, 1971).

Tabelle 1. Durch Trichothecene verursachte oder mitverursachte Krankheiten (nach BAMBURG, 1983)

Bezeichnung	Verbreitung	betroffene Species	Symptome	auslösende Faktoren
Taunelgetreide-Toxikose	UdSSR	Mensch, Haustiere	Schwindel, Erbrechen, Sehstörungen, Futterverweigerung	T-2 Toxin, Deoxynivalenol
Dendrochlo-toxikose	UdSSR	Pferd, Mensch	Blutungen, Hautläsionen	Roridine
Alimentäre Toxische Aleukie	UdSSR	Mensch	Leukopenie, Agranulozytose, Hautläsionen, hämorrhagische Diathese	T-2 Toxin
Red-mold disease	Japan	Rind, Schwein	Erbrechen, Durchfall, Darmblutungen, Dermatitis, Futterverweigerung, Unfruchtbarkeit	Fusarenon X, Nivalenol
Stachybotryotoxikose	UdSSR, Südafrika, Indien	Mensch, Pferd, Rind, Schaf	erhöhte Körpertemperatur, blutiger Durchfall, Anämie	Satratoxine, Roridine
Fusariotoxikose beim Geflügel	USA	Hühner, Tauben	Läsionen in Schnabelhöhle, an Füßen und Unterschenkeln	T-2 Toxin
Moldy Corn Toxicosis	USA	Rind, Schwein	Durchfall, innere Blutungen	T-2 Toxin, DAS u. a. Faktoren
Idiopathischer Abort	USA	Haustiere	Abort	Trichothecene u. a. Faktoren
Bean-Hull Poisoning	Japan	Pferd	ZNS-Störungen, Läsionen im Großhirn	Trichothecene u. a. Faktoren
Futterverweigerung und Erbrechen	weltweit	Haustiere		Trichothecene

2.1.1 T-2 Toxin

T-2 Toxin, 3-Hydroxy-4,15-diacetoxy-8(3-methylbutyryloxy) 12,13 epoxytrichothec-9-en (Abb. 2), gehört in die Gruppe A der Trichothecene (UENO, 1977). Die Summenformel des von BAMBURG et al. (1968) charakterisierten T-2 Toxins ist $C_{24}H_{34}O_9$, das Molekulargewicht beträgt 466,2193 (COLE und COX, 1981).

Da T-2 Toxin bei vielen Mykotoxikosen beteiligt ist (Tab. 1), wurde sein Metabolismus in vitro und in vivo ausführlich untersucht.

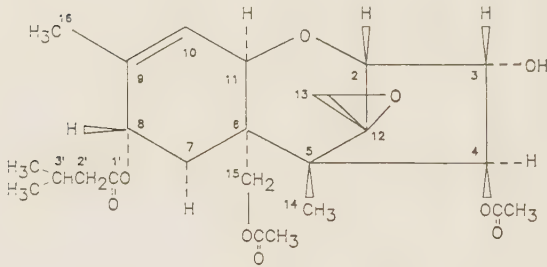


Abbildung 2: Strukturformel von T-2 Toxin

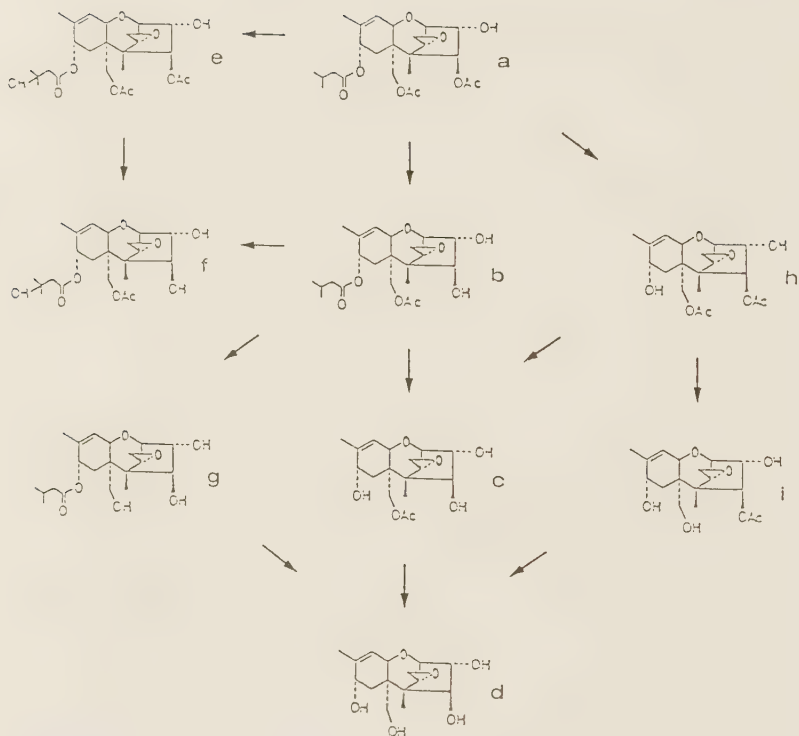
2.1.1.1 Metabolismus

ELLISON und KOTSONIS (1974) sowie OHTA et al. (1977) untersuchten den in vitro-Metabolismus von T-2 Toxin mittels Human- und Rinderleberhomogenisat bzw. Kaninchen- und Rattenlebermikrosomen. Sie konnten als einzigen Metaboliten HT-2 nachweisen, das durch Hydrolyse am C-4 entstanden war. YOSHIZAWA et al. (1980, 1984) ergänzten die Kenntnisse über den Abbauweg für T-2 Toxin in Leberhomogenisaten. Wie durch KNUPP et al. (1986) bestätigt, wurden neben HT-2 noch andere Metaboliten gebildet, die durch Hydrolyse am C-4, C-8 und C-15 Atom und durch Hydroxylierung am C-3' Atom entstehen (Abb. 3). Durch Verwendung von Esterase-Hemmern, die die Hydrolyse unterbinden, läßt sich der Abbauweg vollkommen zur Hydroxylierung verschieben, so daß nur noch 3'-Hydroxy (OH)-Verbindungen (WEI und CHU, 1985; KNUPP et al., 1986) gebildet werden.

GAREIS et al. (1986) fanden bei Experimenten mit isolierten perfundierten Rattenlebern zusätzlich zu den bisher beschriebenen Metaboliten noch T-2 Triol.

Nicht toxisches deepoxidiertes T-2 Toxin bzw. dessen Metaboliten wurden bisher in Versuchen mit Leberhomogenisaten bzw. bei Leberperfusionen nicht gefunden. Sie werden auch durch Leberenzyme nicht erzeugt (BIEGER und DOSE, 1985). Eine vollkommene Entgiftung von T-2 Toxin scheint in vitro nur nach Inkubation mit Pansenorganismen (SWANSON et al., 1987) oder intestinaler Flora (YOSHIZAWA et al., 1985) möglich zu sein.

In Tierexperimenten zeigte sich, daß T-2 Toxin nach intravasaler Applikation sehr schnell aus dem Blut verschwindet und metabolisiert wird. SINTOV et al. (1986) gaben z.B. bei Hunden eine Halbwertszeit von 5,3 min an, BEASLEY et al. (1986) eine solche von 13,8 min bei Schweinen und von 17,4 min bei Rindern.



a T-2 Toxin
 b HT-2
 c 4-Deacetylneosolaniol
 d T-2 Tetraol
 e 3'-OH-T-2

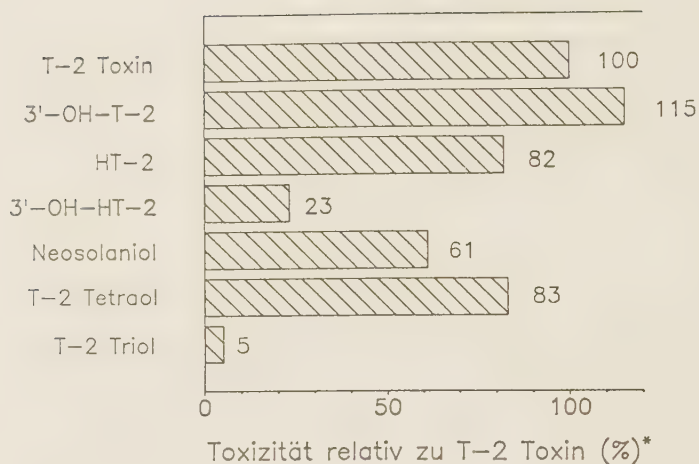
f 3'-OH-HT-2
 g T-2 Triol
 h Neosolaniol
 i 15-Deacetylneosolaniol

Abbildung 3: In vitro-Metabolismus von T-2 Toxin in Ahnlehnung an YOSHIZAWA et al. (1984) und - für T-2 Triol - GAREIS et al. (1986)

CORLEY et al. (1986) isolierten 4 h nach einmaliger intravenöser Gabe von Tritium-markiertem T-2 Toxin im Schwein 21 Metaboliten, wobei die auch in vitro gebildeten (Abb. 3) und einige ihrer deepoxidierten Äquivalente überwogen. Der größte Anteil der verabreichten Radioaktivität wurde im Gastrointestinaltrakt gefunden, wohin er über die Galle gelangt war. Die gleiche Arbeitsgruppe stellte fest, daß schon 10 min nach T-2 Toxingabe im Serum 50% der Metaboliten 3'-OH-T-2 und HT-2 glucuronidiert waren.

Auch bei oraler Applikation wird T-2 Toxin sehr schnell verstoffwechselt. BEASLEY et al. (1986) konnten beim Schwein 1 h nach oraler Gabe einer letalen Dosis kein T-2 Toxin in Leber, Blut oder Urin zu keinem Untersuchungszeitpunkt nachweisen. MATSUMOTO et al. (1978) registrierten im Serum von Mäusen die höchsten Aktivitäten von Tritium-markiertem T-2 Toxin bzw. dessen Metaboliten innerhalb der ersten Stunde post applicationem. Nach 72 h war alles T-2 Toxin ausgeschieden. Bei ähnlichen Experimenten an Ratten fanden dieselben Autoren in den Fäces nur minimale Mengen der Ausgangssubstanz, im Urin nur Metaboliten. Bei einem Fütterungsversuch mit einer Kuh konnten schließlich CHATTERJEE et al. (1986) nach 24 h im Blut nur noch Spuren von T-2 Toxin nachweisen, im Urin nur dessen Abbauprodukte.

Der in vivo-Metabolismus von T-2 Toxin ist charakterisiert durch eine schnelle Resorption und eine schnelle Verstoffwechslung in bei weitem mehr als die in vitro (Abb. 3) entdeckten Metaboliten. T-2 Toxin liegt somit im Gesamtorganismus nur sehr kurze Zeit unverändert vor. Der Abbau des T-2 Toxins scheint eine Maßnahme zur Entgiftung zu sein, da sich nur 3'-OH-T-2 gegenüber der Ausgangssubstanz T-2 Toxin als toxischer erwies (Abb. 4).



*Die Werte wurden errechnet aus den LD₅₀-Werten
(mg/kg Maus) nach intraperitonealer Applikation:

YOSHIZAWA et al. (1982)	T-2 Toxin	5,31
	3'-OH-T-2	4,63
	HT-2	6,50
	3'-OH-HT-2	22,80
UENO und ISHII (1985)	T-2 Toxin	5,2
	T-2 Triol	108,0
THOMPSON und WANNEMACHER (1986)	T-2 Toxin	9,1
	T-2 Tetraol	11,0
	Neosolaniol	14,8

Abbildungung 4: Toxizität einiger Metaboliten von T-2 Toxin
relativ zur Ausgangssubstanz

2.1.1.2 Immunologische Nachweisverfahren

Der Nachweis von T-2 Toxin erfolgt, wie der anderer Trichothecene, hauptsächlich mittels physikalisch-chemischer Methoden (Übersichten im deutschem Schrifttum z.B. bei KABILKA, 1986). In dieser Literaturübersicht soll aber nur auf die für die Arbeit relevanten immunologischen Nachweisverfahren eingegangen werden.

Zur Produktion polyklonaler Antikörper wird T-2 Toxin, das als Hapten mit niedrigem Molekulargewicht per se nicht antigen wirksam ist, an einen Proteinträger z.B. Bovines Serum Albumin (BSA) gekoppelt. Zuvor muß allerdings eine reaktive Gruppe ins Toxinmolekül eingebaut werden, mit der der Proteinträger reagieren kann. Ausgehend von den Angaben von CHU et al. (1979) wurde T-2 Toxin hierfür durchwegs durch Reaktion mit Bernsteinsäureanhydrid zu T-2 Toxin-Hemisuccinat (T-2-HS) derivatisiert, so daß die Versuchstiere in der Regel mit T-2-HS-BSA immunisiert wurden (CHU et al., 1979; PETERS et al., 1982; ESGIN, 1987). ZHANG et al. (1986) setzten allerdings zur Immunisierung ein Carboxymethyloxim-T-2-BSA Konjugat ein.

Die gewonnenen Antikörper gegen T-2 Toxin wurden entweder im Radioimmunoassay (RIA) oder Enzymimmunoassay (EIA) - jeweils als heterogene Verfahren - eingesetzt.

Bei dem von CHU et al. (1979) entwickelten RIA für T-2 Toxin konkurriert eine konstante Menge radioaktiv markierten T-2 Toxins mit unmarkiertem T-2 Toxin um die Bindungsstelle des Antikörpers. Nach Trennung des vom Antikörper gebundenen vom ungebundenen Toxin mittels Ammoniumsulfatfällung (CHU et al., 1979) oder Aktivkohle (FONTELO et al., 1983) wird die gebundene Radioaktivität gemessen. Deren Höhe ist umgekehrt proportional der Konzentration an unmarkiertem Toxin.

Für den EIA sind zwei Anordnungen beschrieben worden:

Beim indirekten EIA wird T-2-HS bzw. ein T-2-HS-Proteinkonjugat an eine Festphase gebunden. Freies Toxin und das vom

Kaninchen gewonnene Antiserum werden simultan inkubiert und die Menge des gebundenen anti-T-2 Toxin Antiserums mittels anti-Kaninchen Immunoglobulin-Enzymkonjugat gemessen. Die Höhe des Substratumsatzes ist bei diesem von mehreren Autoren (PETERS et al., 1982; FAN et al., 1984; GENDLOFF et al., 1984) angewendeten Prinzip umgekehrt proportional der Konzentration an freiem Toxin.

Beim direkten EIA wird das spezifische Antiserum an eine Festphase adsorbiert. Freies und enzymmarkiertes Toxin werden simultan dazugegeben und konkurrieren um die Bindungsstelle des spezifischen Antikörpers. Die Höhe des Substratumsatzes ist bei diesem von PESTKA et al. (1981) und ESGIN (1987) zum Nachweis von T-2 Toxin angewendeten Testprinzip ebenfalls umgekehrt proportional der Konzentration an freiem Toxin. Die Empfindlichkeit dieser immunologischen Nachweisverfahren für T-2 Toxin wurde von den Autoren mit 0.05-5 ng/ml bzw. 0.002-1 ng/Ansatz in Abhängigkeit vom verwendeten Antiserum und von der jeweiligen Probenmatrix angegeben. Indirekte EIAs wurden auch unter Verwendung monoklonaler Antikörper gegen T-2 Toxin durchgeführt (HUNTER et al., 1985; OHTANI et al., 1985; GENDLOFF et al., 1987; GOODBRAND et al., 1987), wobei allerdings die Empfindlichkeit der EIAs in der Regel geringer war als mit den beschriebenen polyklonalen Antiseren.

Auf diese monoklonalen Antikörper wird ausführlich in Abschnitt 2.2.2 eingegangen.

2.1.2 Roridin A

Roridin A (Abb. 5) gehört nach UENO (1977) zur Gruppe D der Trichothecene. Die Summenformel lautet $C_{29}H_{40}O_9$, das Molekulargewicht beträgt 532,2661 (COLE und COX, 1981).

Dieses makrozyklische Trichothecen spielt eine zentrale Rolle in der Biosynthese anderer makrozyklischer Verbindungen (JARVIS et al., 1982).

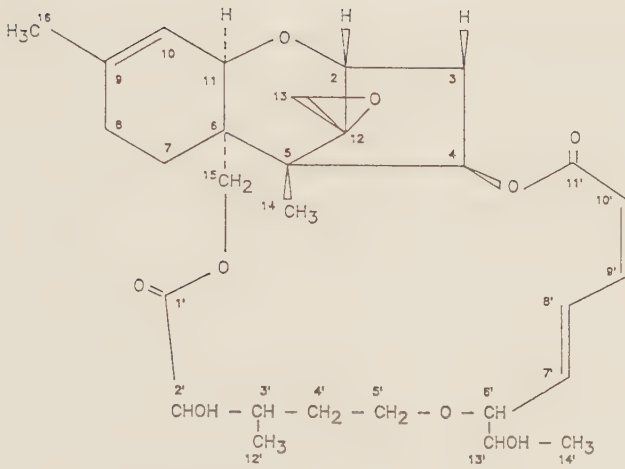


Abbildung 5: Strukturformel von Roridin A

Aus der Vergangenheit sind Vergiftungsfälle bei Pferden durch Roridine bekannt (Tab. 1). Auch die strukturell eng verwandten Satratoxine, gebildet von *Stachybotrys* (*S.*) *atra*, führten zu großen wirtschaftlichen Verlusten. In jüngster Zeit sind auch chronische Vergiftungsfälle beim Menschen durch mit *S. atra*-Sporen kontaminierte Luft beschrieben (CROFT et al., 1986).

2.1.2.1 Vorkommen und Toxizität

Roridin A und einige eng verwandte makrozyklische Verbindungen gehören zu den einzigen Trichothecenen, die außer in Pilzen auch bei zwei in Südamerika beheimateten Asternarten *Baccharis* (*B.*) *megapotamica* (KUPCHAN et al., 1977) und *B. coridifolia* (BUSAM und HABERMEHL, 1983) gefunden wurden. Die Toxine scheinen aber nicht von den A stern, sondern von Pilzen gebildet und von den A stern aufgenommen zu werden. *B. megapotamica* baut aufgenommenes Roridin A um (JARVIS et al., 1987), während *B. coridifolia* es unverändert speichert (JARVIS et al., 1982). Die Aufnahme derartiger Pflanzen ist in Südamerika als Ursache von Vergiftungsfällen bei Weiderindern bekannt (HABERMEHL et al., 1985).

Nach TAMM (1974) gehört Roridin A zu den giftigsten Substanzen, die kein Stickstoffatom im Molekül enthalten. Die LD₅₀-Werte für Mäuse lauten: bei intravenöser Applikation 1,0 mg/kg (HÄRRI et al., 1962), bei intraperitonealer und oraler Applikation 9 mg/kg (HABERMEHL et al., 1985).

Der in vitro-Metabolismus von Roridin A ist nach GAREIS (1988) durch einen gegenüber T-2 Toxin deutlich langsameren Abbau gekennzeichnet. In Experimenten mit isolierten perfundierten Rattenlebern fand er noch mehrere Stunden nach Versuchsbeginn nahezu das gesamte eingesetzte Toxin unverändert wieder.

2.1.2.2 Immunologische Nachweisverfahren

Das bisher einzige immunologische Nachweisverfahren für Roridin A, ein direkter EIA, wurde von MÄRTLBAUER et al. (1988) beschrieben.

Zur Herstellung sowohl des zur Antikörpergewinnung erforderlichen Antigens als auch des Toxin-Enzym-Konjugates wurde Roridin A zu einem Dihemisuccinat derivatisiert und dann an Humanserumalbumin bzw. Meerrettichperoxidase gekoppelt.

Der Nachweis von Roridin A erfolgte im simultanen Verfahren mit einer Doppelantikörpertechnik (ARAKAWA et al., 1981). Dabei wurde anti-Kaninchen IgG an die Festphase adsorbiert, das Toxin-Enzym-Konjugat und freies Toxin sowie - nach Vermischen der beiden Reagenzien - anti-Roridin A Antiserum dazugegeben und die Reaktionsmischung 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Als Substrat kamen H_2O_2 und 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin zum Einsatz (GALLATI und PRACHT, 1985), die Messung des Substratumsatzes erfolgte bei 450 nm. Als Nachweisgrenze geben die Autoren 5 ng/ml bzw. 0,16 ng/Ansatz an.

Während das Antiserum mit anderen makrozyklischen Trichothecenen (Roridin J, Verrucarin A, Satratoxin H und G) eine relative Kreuzreaktivität von 40,7% bis 6,5% aufwies, reagierten von 16 getesteten nicht-makrozyklischen Trichothecenen lediglich Diacetylverrucarol (0,15%) und Verrucarol (0,05%).

2.2 Monoklonale Antikörper

Das Immunsystem der Maus hat theoretisch die Fähigkeit 10^9 verschiedene Antikörper zu bilden (TONEGAWA, 1985). Schon durch Immunisierung mit einem einfachen Hapten wie NIP (3-Nitro-, 4-hydroxy, 5-iodophenylacetyl) werden mindestens 8000 verschiedene Antikörper gebildet (KRETH und WILLIAMSON, 1973), die unterschiedlichste Affinitäten und Spezifitäten besitzen und zu verschiedenen Immunglobulinklassen bzw. -subklassen gehören können. Dieses komplexe Gemisch bildet das sogenannte Hyperimmunserum oder polyklonale Antiserum, dessen Zusammensetzung sich dauernd ändert und von Individuum zu Individuum unterschiedlich ist.

Nach der Klonselektionstheorie bilden ein Antigen-stimulierter B-Lymphozyt und seine Tochterzellen nur einen einzigen Antikörper (ROITT et al., 1985). Die in vitro-Züchtung dieser stimulierten B-Lymphozyten wäre theoretisch eine Möglichkeit zur Produktion monoklonaler, also identischer, Antikörper. Praktisch ist dies aber nicht möglich, da B-Lymphozyten in vitro nur wenige Tage lebensfähig sind. Im Gegensatz dazu sind entartete B-Lymphozyten (Myelomzellen) in vitro unbegrenzt lebensfähig, aber nicht in der Lage auf einen antigenen Reiz zu reagieren.

2.2.1 Allgemeines zur Hybridomtechnologie

Ausgehend von diesen Voraussetzungen fusionierten KÖHLER und MILSTEIN (1975) mit Schaferythrozyten stimulierte und spezifische Antikörper produzierende B-Zellen aus der Milz mit einer Myelomzelllinie und erzielten so Hybridzellen, die die Eigenschaften ihrer Elternzellen in sich vereinigten. Es gelang ihnen auf diese Weise einen unbegrenzten Nachschub eines spezifischen Antikörpers zu sichern (Abb. 6).

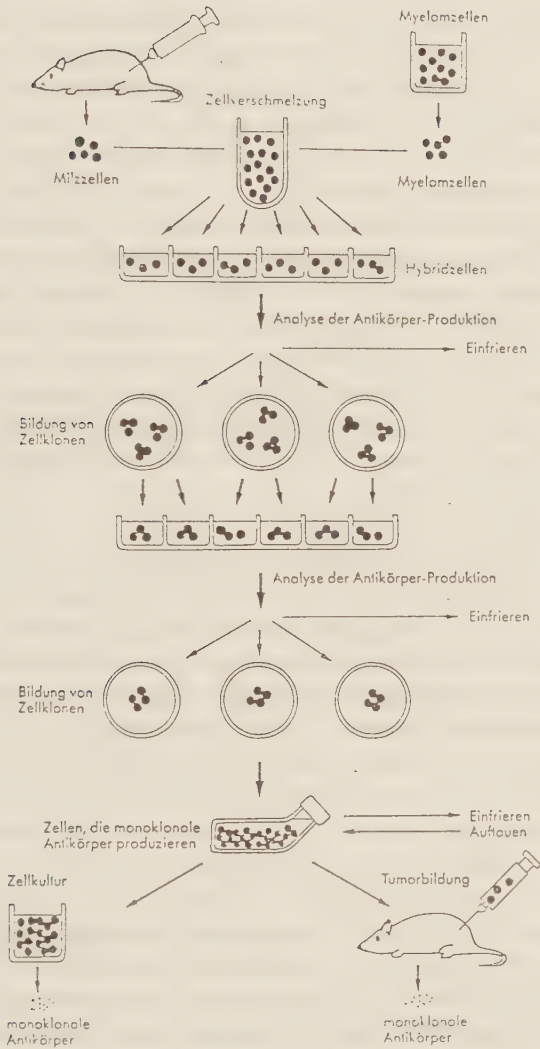


Abbildung 6: Herstellung monoklonaler Antikörper

(aus MILSTEIN, 1980)

KÖHLER und MILSTEIN (1975) verwendeten noch Myelomzelllinien, die selbst Antikörper sezernierten, während heute zur Fusion meist sogenannte "non-producer"-Varianten verwendet werden, die entweder keine Antikörper mehr sezernieren, wie P3-NSI/1-Ag4-1 (KÖHLER et al., 1976), oder keine mehr synthetisieren wie X63-Ag8.653 (KEARNY et al., 1979) oder Sp2/0-Ag-14 (SHULMAN et al., 1978). Die Fusionspartner B-Lymphozyt und Myelomzelle sollten möglichst von derselben oder einer phylogenetisch eng verwandten Spezies stammen. Die durch Chromosomenverluste verursachte genetische Instabilität führt besonders bei Interspezieshybridomen sehr leicht zum Erlöschen der Antikörperproduktion oder zu deren Absterben (KÖHLER und SHULMAN, 1978). Trotzdem sind stabile Hybridome zwischen Mausmyelomzellen und Kaninchen-, Rinder- bzw. Schweinelymphozyten produziert worden (SAMOILOVICH et al., 1987).

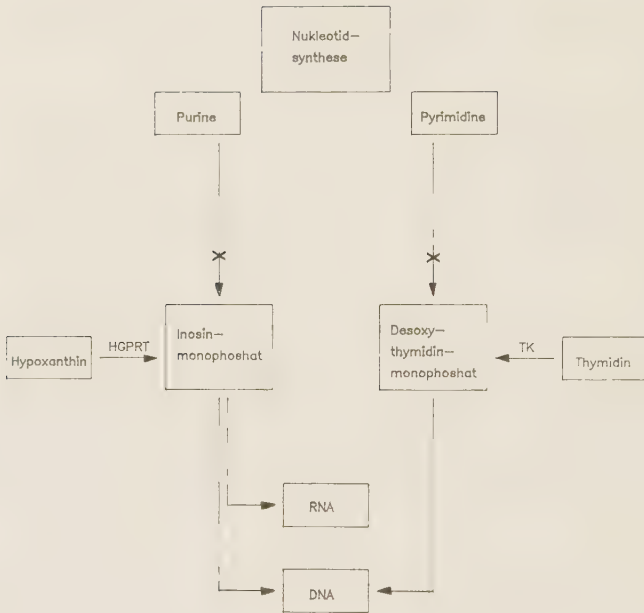
Schon KÖHLER und MILSTEIN (1975) stellten bei ihren ersten Fusionen fest, daß die Rate an antikörperproduzierenden, sogenannten positiven Hybridomen höher war als erwartet. In einem vorher durchgeführten Plaque-Test mit stimulierten Milzzellen hatten sie nämlich deutlich weniger Plaque-bildende Zellen gefunden. YELTON et al. (1980) führen diese "Anreicherung" auf selektive Fusion zwischen Myelom- und proliferierenden B-Zellen oder auf die Bildung positiver Hybridome aus Myelomzellen und nicht-plaquebildenden Vorläuferzellen zurück.

Die Produktion antikörperbildender Hybridome setzt voraus, daß die zur Fusion geeigneten B-Zellen in ausreichender Anzahl zur Verfügung stehen. Dies versucht man dadurch zu erreichen, daß den Spendertieren nach einer mehr oder weniger langen Immunisierungsphase an den letzten vier Tagen vor der Fusion (STÄHLI et al., 1980) oder nur am dritten Tage vor der Fusion (OI et al., 1978) hohe Dosen von Antigen verabreicht wurden. In Zukunft wird aber die in vitro-Immunisierung - insbesondere in der Humanmedizin - eine

größere Rolle spielen (BORREBAECK, 1986).

Als Fusogen verwendete man anfangs inaktivierte Sendai-Viren, heute aber meist Polyethylenglykol (PEG); die Fusion mittels elektrischer Impulse (VIENKEN und ZIMMERMANN, 1982; GAL, 1987) ist bisher kaum verbreitet. Zahlreiche Autoren haben Fusionsprotokolle mit PEG beschrieben (GALFRE et al., 1977; GEFTER et al., 1977; FAZEKAS DE ST. GROTH und SCHEIDEGGER, 1980; GALFRE und MILSTEIN, 1981), in denen die fusogene und toxische Wirkung des PEG im Gleichgewicht gehalten werden. Der genaue Wirkungsmechanismus des PEG ist allerdings noch nicht bekannt. Die Zellfusion läuft nach KNUTTON und PASTERNAK (1979) in drei Phasen ab. In der ersten Phase, der Zellagglutination, in der das hydrophile PEG den Zellmembranen Wasser entzieht, kommt es zu einer Aggregation der Zellen. In der Phase der Membranfusion bilden sich Plasmabrücken zwischen benachbarten Zellen und in der letzten Phase kommt es durch Veränderung der osmotischen Verhältnisse und Schwellung der Zellen zur Bildung sphärischer Polykaryozyten. Bei der nächsten Zellteilung verschmelzen die Zellkerne und die Tochterzellen erhalten einen mehr oder weniger gleichmäßigen Anteil des genetischen Materials. Die folgenden Teilungsschritte entscheiden über die Lebensfähigkeit der entstandenen Hybridome.

Zur Selektion lebensfähiger Hybridome aus dem Gemisch fusionierter, unfusionierter und falsch-fusionierter Zellen geht man nach der Methode von LITTLEFIELD (1964) vor. Dabei nutzt man die Tatsache aus, daß die verwendeten Myelomzellmutanten Enzymdefekte aufweisen und daher Ausweichrouten bei der Nukleinsäure-Synthese nicht beschreiten können, die normalen Zellen zur Verfügung stehen, wenn die Hauptwege der Biosynthese durch den Folsäureantagonisten Aminopterin im Zellkulturmedium blockiert sind. Eine normale Zelle weicht dann aus, indem sie exogenes Hypoxanthin und Thymidin aus dem Zellkulturmedium über die Enzyme Hypoxanthin-Guanosin-



X Stelle der Blockierung durch Aminopterin

HGPRT Hypoxanthin-Guanosin-Phosphoribosyl-Transferase

TK Thymidin-Kinase

Abbildung 7: Schema der Nukleinsäurebiosynthese
und der Selektionsprinzipien

Phosphoribosyl-Transferase (HGPRT) und Thymidin-Kinase (TK) in den Stoffwechsel einschleust. Bei Hybridomen aus Milzzellen, die diese Enzyme besitzen, und Myelomzellen, die sie nicht besitzen, ist die Nukleinsäure-Synthese möglich; unfusionierte Milzzellen sind in vitro nur wenige Tagen lebensfähig (Abb. 7).

Da Hybridome in geringer Zelldichte, insbesondere unmittelbar nach der Fusion, schlecht wachsen, werden sie auf einen "Feeder-Layer" aus anderen Zellen ausgesät. Dessen Aufgabe besteht in der Phagozytose von Zelldetritus und in der Synthese von Wachstumsfaktoren. Zur Anwendung kommen Peritonealmakrophagen (FAZEKAS DE ST. GROTH und SCHEIDEGGER, 1980), unfusionierte Milzzellen (GALFRE und MILSTEIN, 1981) und Thymuszellen (OI et al., 1978). Nach einiger Zeit kann normalerweise auf den Zusatz von "Feeder-Layer" verzichtet werden, wenngleich manche Arbeitsschritte immer ihren Einsatz verlangen.

Antikörper-positive Hybridome sollten sobald als möglich kloniert werden, um zu verhindern, daß sie von Nicht-Produzenten überwuchert werden. LOVBORG (1982) zeigte, daß in einer biklonalen Kultur durch unterschiedliche Wachstumeigenschaften von erwünschten und unerwünschten Klonen die Antikörperproduktion zurückgehen und schließlich ganz sistieren kann. Für die Klonierung kommen mehrere Methoden zur Anwendung:

1. Klonierung in Weichagar (COFFINO et al., 1972)

In einer Petrischale wird fester Grundagar mit einem Hybridome enthaltenden Weichagar überschichtet. Einzelkolonien, die mikroskopisch erkannt wurden, werden vom Weichagar in ein flüssiges Medium verbracht und auf Antikörperproduktion getestet.

2. Klonierung nach dem Prinzip der Endpunktverdünnung

(LEFKOVITS und WALDMANN, 1979; GODING, 1980)

Hybridome werden so verdünnt, daß in jeweils 30 Kavitäten einer Mikrotiterplatte 10, 3 bzw. 0,5 Zellen pro Kavität ausgesät werden. Die Verdünnung, bei der ca. 50% der beschickten Kavitäten Wachstum zeigen, enthält einzelne Klone, die weiter kultiviert werden. Da aber insbesondere bei der ersten Klonierung unmittelbar nach der Fusion nur wenige Kavitäten überhaupt eine positive Antikörperreaktion aufweisen, müssen diese Kavitäten sofort rekloniert werden. Erst wenn annähernd 100% der bewachsenen Kavitäten einer Klonierungsplatte Antikörperproduktion zeigen, kann die getestete Kultur als monoklonal angesehen werden. Bei dieser Methode ist die Verwendung von "Feeder-Layer" immer empfehlenswert, da bei den hohen Verdünnungen die Wachstumsbedingungen für die Hybridome verbessert werden.

3. Klonierung mit einem Fluoreszenz-aktivierten Zellsortierer (PARKS et al., 1979)

Hybridome und fluorochrommarkiertes Antigen werden zusammen inkubiert. Antikörper auf der Zelloberfläche des gewünschten Hybridoms binden das fluorochrommarkierte Antigen. Nach Entfernung des ungebundenen Antigens wurden antigenbindende Hybridome mittels der Fluoreszenz identifiziert und vom Gerät einzeln in jeweils ein Zellkulturgefäß transferiert.

Um die Monoklonalität einer Zelllinie zu gewährleisten, sollte die Klonierung mindestens zweimal durchgeführt werden.

Hybridome sezernieren den monoklonalen Antikörper in das Medium in einer Konzentration von 10 bis 100 µg/ml (GALFRE und MILSTEIN, 1981). Mittels Ammoniumsulfatfällung kann der Zellkulturüberstand gereinigt und aufkonzentriert werden (JONAK, 1980).

Wenn größere Mengen von Antikörpern benötigt werden, werden

die Hybridome unter Beachtung der Histokompatibilität in vivo als Tumoren gezüchtet. Nach subkutaner Transplantation wird der Antikörper aus dem Serum, nach intraperitonealer Transplantation aus der Ascitesflüssigkeit gewonnen. Die erzielten Mengen bewegen sich im Bereich von mehr als 10 mg/ml (GALFRE und MILSTEIN, 1981). Das Angehen der Ascites-tumoren wird durch eine einmalige Vorbehandlung mit 0,5 ml Pristan (2,6,10,14 Tetramethylpentadecan) intraperitoneal zehn Tage vor der Transplantation begünstigt (HOOGENRAAD et al., 1980). In jüngerer Zeit haben MUELLER et al. (1986) als Vorbehandlung die Verwendung von inkomplettem Freund'schen Adjuvans beschrieben. Dadurch konnte die Zahl der benötigten Hybridome verringert und die Zeit zwischen Vorbehandlung und Transplantation auf einen Tag verkürzt werden.

2.2.2 Monoklonale Antikörper gegen Trichothecene

Die Nachteile der polyklonalen Antiseren, insbesondere die nur begrenzte Menge eines identischen Serums, haben auch eine nur begrenzte Standardisierbarkeit der auf der Verwendung dieser Antiseren beruhender immunologischen Nachweise zur Folge. Diese Überlegungen veranlaßten mehrere Autoren zur Produktion von monoklonalen Antikörpern auch gegen die Trichothecene T-2 Toxin (HUNTER et al., 1985; OTHANI et al., 1985; GENDLOFF et al., 1987; GOODBRAND et al., 1987) und Diacetoxyscirpenol (PAULY et al., 1986). Die Ergebnisse für T-2 Toxin sind zusammengefaßt in Tab 2. Die aufgeführten sechs monoklonalen Antikörper gegen T-2 Toxin unterscheiden sich deutlich in den Kreuzreaktionen und auch in den Affinitäten (beim letzten Punkt ist die Einschränkung zu machen, daß die vorliegenden Daten meist nur für das jeweilige Nachweissystem gelten und deshalb nur bedingt vergleichbar sind). Die Autoren verwendeten zur Immunisierung T-2 Toxin-HS-Protein-Konjugate, die im Prinzip nach der Methode von CHU

Tabelle 2. Monoklonale Antikörper gegen T-2 Toxin

Toxin	Kreuzreaktionen der Antikörper (%)					
	12C12 ^a	15H6 ^{a,e}	7D4 ^b	6E9 ^b	c	d
T-2 Toxin	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
HT-2	31,0	>100,0	1,5	0	2,0	22,0
Acetyl T-2	*	*	>100,0	>100,0	24,5	*
T-2 Triol	*	0,2	*	*	0,15	0
T-2 Tetraol	*	0	*	*	0,005	0
3'-OH-T-2	*	0,4	1,5	0	>100,0	*
3'-OH-HT-2	*	2,6	0	0	23,0	*
Nachweisgrenze (ng/Ansatz)	50,0	50,0	0,025	25,0	0,5	2,0
Immunglobulin- klasse	IgG1	IgG1	*	*	IgG1	IgG1
Antigen ⁺	T-2-gIgG	T-2-gIgG	T-2-BSA	T-2-BSA	T-2-BSA	T-2-KLH
Beschichtungs- konjugat(c) ⁺	T-2-BSA	T-2-BSA	T-2-OVA T-2-KLH	T-2-OVA T-2-KLH	T-2-PLL T-2-OVA	T-2-BSA

^a BSA: Bovines Serum Albumin, KLH: Keyhole Limpet Hemocyanin, PLL: Polylysin,
OVA: Ovalbumin, gIgG: Ziegen IgG

* keine Angaben

0 im getesteten Bereich keine 50%-Hemmung zu erreichen

^a HUNTER et al., 1985; ^b OHTANI et al., 1985; ^c GENDLOFF et al., 1987;

^d GOODBRAND et al., 1987; ^e SWANSON et al., 1987

et al. (1979) hergestellt wurden, wählten zum Teil aber verschiedene Proteinträger und Applikationswege. HUNTER et al. (1985) stellten fest, daß aus dem zur Immunisierung verwendeten T-2-BSA wieder T-2 Toxin freigesetzt wurde und dieses in vitro die Proteinbiosynthese, in vivo vermutlich die Immunantwort negativ beeinflusste. Sie empfahlen daher, das T-2-BSA vor der Applikation ausgiebig zu dialysieren, um das freie T-2 Toxin abzutrennen.

Alle Autoren verwendeten zum Nachweis antikörperproduzierender Hybridome indirekte EIAs und stellten für die Beschichtung der Festphase ein zweites Toxin-HS-Protein-Konjugat her, um nicht auf Antikörper gegen das zur Immunisierung verwendete Trägerprotein zu selektieren. Der Nachweis des gebundenen Antikörpers erfolgte mit anti-Maus Immunglobulin- bzw. IgG-Enzymkonjugat oder unter Einschaltung eines zusätzlichen Schrittes mit Kaninchen anti-Maus IgG1 und Ziegen anti-Kaninchen IgG-Enzymkonjugat (HUNTER et al., 1985).

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß die bisher beschriebenen, auf monoklonalen Antikörpern gegen T-2 Toxin beruhenden EIAs in der Empfindlichkeit den entsprechenden EIAs mit polyklonalen Antiseren unterlegen sind. Diese monoklonalen Antikörper können somit die Antiseren in der Analytik nicht ersetzen.

Der einzige monoklonale Antikörper gegen ein anderes Trichothecen wurde von PAULY et al. (1986) beschrieben. Es handelte sich um einen IgM Antikörper gegen Diacetoxyscirpenol (DAS). Im indirekten EIA detektierte der Antikörper das Toxin bis zu einer Konzentration von 1 ng/ Ansatz. Die Kreuzreaktionen mit strukturell verwandten Trichothecenen betrugen: Triacetoxyscirpenol 180%, 15-Acetoxyscirpenol 80%, Diacetylverrucarol 15%, 4-Acetoxyscirpenol 2% und Scirpentriol 0,1%. Mit anderen getesteten Trichothecenen (Verrucarol, T-2 Toxin, T-2 Tetraol, Deoxynivalenol,

3 α -Acetyldeoxynivalenol, Trichothecin) gab es keine Kreuzreaktionen.

2.2.3 Passive Immunisierung mit monoklonalen Antikörpern gegen Trichothecene

Eine weitere Anwendungsmöglichkeit speziell für große Mengen monoklonaler Antikörper ist ihr Einsatz in der passiven Immunisierung als Propylaxe und Therapiemaßnahme.

FEUERSTEIN et al. (1985) berichteten über die Verwendung monoklonaler Antikörper gegen T-2 Toxin. Sie verabreichten Ratten den Antikörper 15H6 (HUNTER et al., 1985; s.a. Tab. 2) in zwei verschiedenen Konzentrationen und das T-2 Toxin in letaler Dosis (1 mg/kg Ratte) jeweils intravasal. Bei Applikation von 250 mg/kg Antikörper 30 min vor bzw. 15 min nach Toxingabe überlebten 100% der Tiere, bei Antikörpergabe 60 min nach Toxinapplikation noch 45%. Nur noch 25% der Tiere überlebten, wenn die halbe Antikörpermenge 15 min nach Toxinapplikation gegeben wurde, allerdings starben die Tiere später als die Kontrolltiere.

3. Eigene Untersuchungen

3.1 Herstellung und Charakterisierung monoklonaler Antikörper gegen T-2 Toxin^{*)}

3.1.1 Material

Versuchstiere

Als Versuchstiere dienten BALB/c-Mäuse beiderlei Geschlechts aus eigener Nachzucht, die in Makrolon-Käfigen gehalten wurden. Futter (Altromin 1324, Haltungsdiät-Ratten und Mäuse, Altromin, Lage) und Wasser wurden ad libitum gegeben.

Reagenzien

Die Trichothecene T-2 Toxin, HT-2, Acetyl T-2, Iso T-2, T-2 Triol, T-2 Tetraol, T-2 Tetraoltetraacetat, Diacetoxyscirpenol, 3 α -Acetyldiacetoxyscirpenol, Scirpentriol, Verrucarol und Roridin A, T-2 Toxin Bovines Serum Albumin-Konjugat (T-2-BSA), Freund'sches Adjuvans (komplett und inkomplett) und affinitätschromatographisch gereinigtes anti-Maus IgG wurden von Sigma, Deisenhofen bezogen, Fetales Kälberserum (FKS) von Flow, Meckenheim oder Seromed, Berlin.

Die Trichothecene Nivalenol, Deoxynivalenol und Neosolaniol kamen von Wako Chemicals, Neuss.

Alle anderen nicht besonders gekennzeichneten Chemikalien und Lösungsmittel wurden von Merck, Darmstadt, in pro analysi-Qualität bezogen.

Die bei den Untersuchungen verwendeten HT-2 und T-2 Toxin-Peroxidase-Konjugate (HT-2-HRP und T-2-HRP) wurden von ESGIN (1987) am Lehrstuhl hergestellt.

^{*)} Teile dieses Abschnittes wurden von HACK et al. (1987) publiziert

Geräte

Mehrkanalpipetten, 8er und 12er (Titertek, Flow, Meckenheim)

Sterile Werkbank (Flow, Meckenheim)

CO₂-Brutschrank 5061 EC/CO₂ (Heraeus, Hanau)

Zentrifuge Minifuge GL (Heraeus Christ, Osterode)

Gefriertruhe UF85-170T (Colora Meßtechnik, Lorch)

Inverses Mikroskop, IM (Zeiss, Oberkochen)

ELISA-Auswertegerät Titertek Multiskan MCC/340 (Flow, Meckenheim)

Zählkammer nach NEUBAUER

Kunststoffmaterialien

Alle Zellkulturgefäße (96-Loch-Platten, 24-Loch-Platten, 25 cm²-, 75 cm²-Flaschen), Einfriergefäße (Cryotubes 1,8 ml), EIA-Platten (Immuno-Platte I F) und MicroWell Module F8 und F16 wurden von Nunc, Wiesbaden, bezogen.

3.1.2 Methodik

3.1.2.1 Immunisierung der Mäuse

Acht weibliche BALB/c-Mäuse im Alter von ca. sechs Wochen wurden am 1. und 22. Versuchstag mit jeweils 100 µg T-2-BSA, das ausgiebig gegen PBS dialysiert worden war (HUNTER et al., 1985), intraperitoneal grundimmunisiert. Der Proteingehalt der Antigenlösung wurde vor und nach der Dialyse nach der Methode von LOWRY et al. (1951) bestimmt. Für die erste Injektion wurde die Antigenlösung (100 µl in sterilem PBS) im Verhältnis 1+2 in komplettem, für die folgende Injektion in inkomplettem Freund'schen Adjuvans emulgiert. Jeweils ca. zwei Wochen nach den Injektionen wurden den Tieren aus dem orbitalen Venenplexus mit einer Glaskapillare ca. 15 Tropfen Blut entnommen. Zur Serumgewinnung

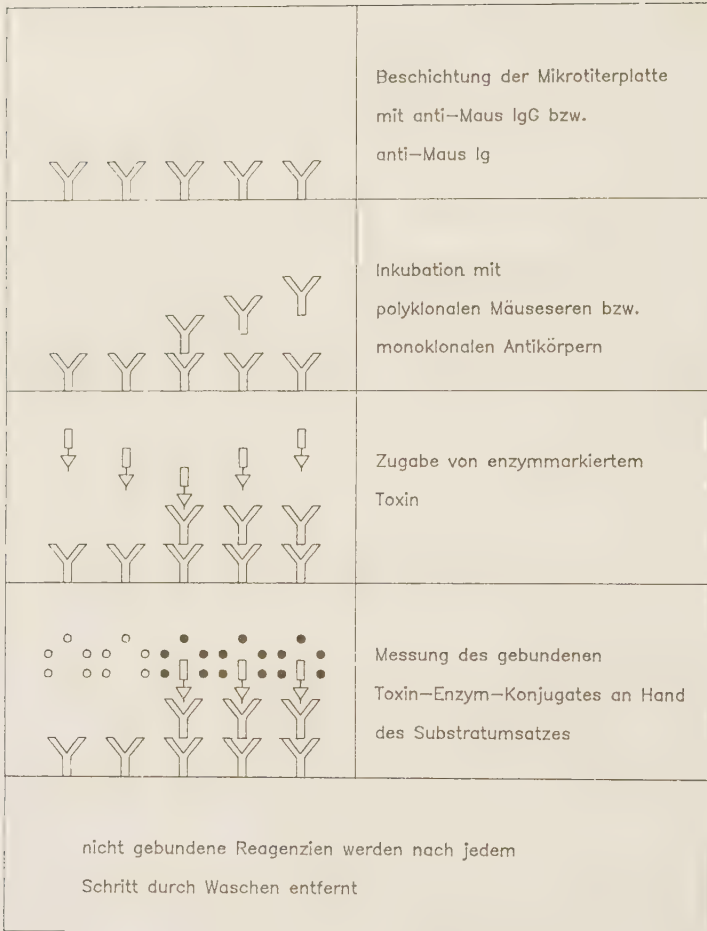


Abbildung 8: Prinzip des direkten Enzymimmunoassays
mit Doppelantikörpertechnik zum
Nachweis von spezifischen
Antikörpern

wurde das Blut 1 h bei Raumtemperatur, 3 h bei 4°C inkubiert und dann 30 min bei 4°C mit 1700 x g zentrifugiert. Danach wurden die anti-T-2 Toxin Serumtitrier bestimmt.

Für den Antikörpernachweis wurde ein Enzymimmunoassay (EIA) mit einer Doppelantikörpertechnik (ARAKAWA et al., 1981) (Abb. 8) verwendet, zumal sich diese Technik bei anderen Versuchen im Hause bewährt hatte (MÄRTLBAUER et al., 1988): Die Kavitäten von Mikrotiterplatten wurden mit jeweils 100 µl einer Lösung von anti-Maus IgG (10 µg/ml in Carbonat/Bicarbonatpuffer) beschichtet (3 h bei 37°C oder über Nacht bei Raumtemperatur), ausgeklopft und 30 min mit jeweils 150 µl PBS/3% FKS abgesättigt. Nach einem Waschschriff wurden die Antiseren in einer Vorverdünnung von 1+99 in PBS auf die Platte gegeben und 1+3 weiterverdünnt. Nach einstündiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden ungebundene Antikörper gewegewaschen. Auf Grund der Erfahrungen von ESGIN (1987) mit einem direkten EIA zum Nachweis von T-2 Toxin wurde HT-2-HRP als heterologes Enzymkonjugat eingesetzt (100 µl einer Verdünnung 1:1000 in PBS/1% FKS). Eine Stunde später wurde die bei Zimmertemperatur inkubierte Platte erneut gewaschen und die Substratlösung (100 µl) dazupipettiert. Die Reaktion wurde nach genügender Farbentwicklung (ca. 5 min) mit 25 µl einer 1,25 mol/l Schwefelsäure gestoppt. Zur Auswertung wurden die Extinktionen im Photometer bei 490 nm gemessen.

Da dieses Nachweisverfahren auch für den Nachweis von Antikörpern im Zellkulturüberstand (siehe 3.1.2.3) vorgesehen war, wurden Serumverdünnungsreihen parallel auch in HT- und HAT-Medium angelegt.

3.1.2.2 Zellkulturbedingungen und Fusion

Die zur Durchführung der Fusion erforderlichen Manipulationen sind aufgelistet in Tab. 3.

Fünf Tage vor der geplanten Fusion wurde zur Gewinnung von

Tabelle 3: Zeitlicher Arbeitsablauf fünf Tage vor bis 14 Tage
nach einer Fusion

Tag	Arbeitsablauf
- 5	Vorbehandlung von zwei BALB/c-Mäusen mit jeweils 1,5 ml Fluid Thioglycollate Medium
- 3	Letzte Restimulierung der immunisierten Mäuse mit Antigen ohne Adjuvans
-2 oder -1	Vorbereitung von fünf 96-Loch-Zellkulturplatten mit Makrophagen als "Feeder-Layer" in HAT-Medium
-1	Vorbereitung der Myelomzellen durch Teilung der Kulturen im Verhältnis 1+3 in HT-Medium
+ 0	F U S I O N
+ 3	Mediumwechsel (HAT-Medium)
+ 7	Mediumwechsel (HAT-Medium)
+ 10	Mediumwechsel (HAT-Medium)
+ 13 oder 14	Test auf Antikörperproduktion Mikroskopische Untersuchung Umstellen auf HT-Medium

Makrophagen als "Feeder-Layer" zwei BALB/c-Mäusen intraperitoneal 1-1,5 ml steriles Fluid Thioglycollate Medium (Difco, Hamburg) (SCHIMMELPFENG et al., 1980) appliziert. Nach drei bis vier Tagen wurden die Tiere in Äthernarkose durch Genickdislokation getötet. Durch Spülung der Bauchhöhle der in Äthernarkose durch Genickdislokation getöteten Tiere mit sterilem PBS wurden die Peritonealmakrophagen gewonnen. Diese wurden mehrmals in sterilem PBS gewaschen. In sterilem HAT-Medium suspendiert wurden sie in einer geschätzten Zahl von 4000-5000 pro Kavität in fünf 96-Loch-Zellkulturplatten ausgesät und bei 37°C, 5% CO₂ inkubiert.

Drei Tage vor der Fusion (am 45. Versuchstag) erhielten die mit T-2-BSA grundimmunisierten Mäuse, deren anti-T-2 Toxin Serumtiter mindestens 1:20000 betrug, eine letzte intraperitoneale Injektion von T-2-BSA (150 µg in PBS ohne Adjuvans).

Einen Tag vor der Fusion wurden die Myelomzellen X63-Ag8.653 (KEARNEY et al., 1979), die in 75 cm²-Zellkulturflaschen in HT-Medium kultiviert wurden, im Verhältnis 1+3 geteilt und mit frischem HT-Medium versorgt, um sie in optimaler Wachstumscondition zu halten.

Am Tag der Fusion wurden die mit T-2-BSA immunisierten Mäuse in Äthernarkose durch Genickdislokation getötet. Nach Öffnen der Bauchhöhle wurde unter sterilen Kautelen die Milz entnommen und grob zerkleinert. Mittels eines Spritzenkolbens wurden die Milzfragmente unter Zutropfen von sterilem PBS durch ein Sieb mit Maschenweite 60 µm in eine Petrischale gedrückt. Aus der entstandenen Zellsuspension setzten sich in einem konischen Zentrifugenglas innerhalb von zwei Minuten größere Milzpartikel ab. Der Überstand wurde in ein zweites Zentrifugenglas überführt und bei 120 x g für 5 min zentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde in 5 ml PBS resuspendiert.

Parallel dazu wurden die Myelomzellen in Suspension gebracht und in ein konisches Zentrifugenglas verbracht. Nach Zentrifugieren ($120 \times g$ für 5 min) wurde das Pellet in 5 ml PBS resuspendiert und die Zellzahl mittels einer Zählkammer bestimmt.

Die Milzzellen ($\text{ca. } 10^8$) und Myelomzellen (10^7) wurden miteinander vermischt und zentrifugiert. Der Überstand wurde komplett abgesaugt und das trockene Pellet durch Schütteln etwas gelockert. Zur Fusion wurde 1 ml Polyethylenglykol (PEG 1500, 50%ig in Hepes-Puffer, Boehringer Mannheim) verwendet. Es wurde folgender Zeitplan, jeweils bei Zimmertemperatur, in Anlehnung an STAVROU et al. (1983) eingehalten:

- 0.-1. min 1 ml PEG unter Schütteln auf das trockene Pellet geben,
- 1.-2. min 1 ml DMEM dazutropfen,
- 2.-3. min 2 ml DMEM dazutropfen,
- 3.-5. min 4 ml HT-Medium dazugeben.

Nach einstündiger Inkubation im Brutschrank (37°C , 5% CO_2) und Zentrifugation ($120 \times g$ für 5 min) wurde der Überstand dekantiert, das Pellet vorsichtig in 15 ml HAT-Medium suspendiert und auf die o.a. fünf mit Makrophagen vorbereiteten Platten ausgesät. In einige Kavitäten wurden zur Kontrolle der HAT-Selektion nur unfusionierte Myelomzellen verbracht. Anschließend wurden die Kavitäten mit jeweils 100 μl HAT-Medium aufgefüllt und wie üblich inkubiert. Zweimal pro Woche, das erste Mal nach drei Tagen, wurde das Medium zur Hälfte abgesaugt und durch frisches HAT-Medium ersetzt. Spätestens nach zwei Wochen, sobald die unfusionierten Myelomzellen in den Kontrollkavitäten im HAT-Medium abgestorben waren, wurde HT-Medium statt HAT-Medium eingesetzt.

Hybridome mußten unmittelbar nach der Fusion und noch mehrere Monate danach auf einem "Feeder-Layer" gezogen werden,

da sie sonst abstarben. Erst danach konnten die Hybridome makrophagenfrei kultiviert werden.

3.1.2.3 Nachweis antikörperproduzierender Hybridome

Am Ende der zweiten Woche wurden die "Fusionsplatten" auf Antikörperproduktion getestet. Dazu wurden mit einer 8-Kanal-Pipette unter sterilen Kautelen jeweils 100 µl Zellkulturüberstand auf eine mit anti-Maus IgG Serum beschichtete und mit PBS/3% FKS abgesättigte Mikrotiterplatte transferiert.

Der Nachweis der Antikörper lief ab wie unter 3.1.2.1 beschrieben, allerdings wurde die Zeit für die Farbentwicklung auf 20 min festgesetzt.

Positive Kavitäten wurden mikroskopisch auf Wachstum von Hybridomen untersucht und mit frischem HT-Medium aufgefüllt. Der Test auf Antikörperproduktion wurde einige Tage später wiederholt. Der Inhalt von Kavitäten, die weiterhin positiv waren, wurde bei genügendem Wachstum der Hybridome in eine andere Zellkulturplatte mit "Feeder-Layer" umgesetzt. Nach genügendem Wachstum wurden die Hybridome wieder getestet.

Es blieb eine positive Kultur übrig, die nach der Lage ihres Ursprungslochs auf der Fusionsplatte als 1C4 bezeichnet wurde.

Diese Kultur wurde umgesetzt und expandiert sowie ein Teil davon sobald als möglich eingefroren. Dazu wurden die Zellen in anfangs variierenden Zellzahlen in HT-Medium + 10% Dimethylsulfoxid (DMSO) (Serva, Heidelberg) verbracht, in 1,5 ml Portionen in Nunc Cryotubes abgefüllt und bei -80°C eingefroren.

Zum Auftauen wurden die Cryotubes in ein Wasserbad mit 37°C gestellt. Die Zellsuspension wurde nach dem Auftauen in 10 ml HT-Medium verdünnt und zentrifugiert. Das Pellet wurde in HT-Medium aufgenommen und die Hybridome wurden auf 24-Loch-Platten mit "Feeder-Layer" ausgesät.

3.1.2.4 Klonierung

Die Kultur 1C4 wurde eine Woche nach der ersten Prüfung auf Antikörperbildung unter Verwendung von "Feeder-Layer" kloniert. Es erschien Eile geboten, da bei der mikroskopischen Untersuchung mehrere gleichgroße Klone im Ursprungsloch gefunden wurden. Es wurde eine Zellsuspension so hoch verdünnt, daß pro Mikrotiterkavität 10, 3 und 0,5 Zellen (GODING et al., 1980) ausgesät wurden, und bei 37°C, 5% CO₂ bebrütet. Etwa zwei Wochen später wurden die Kolonien getestet und mikroskopisch untersucht. Nach dieser Klonierung waren nur wenige Kavitäten positiv. Die beiden Kavitäten mit den höchsten Extinktionen und den geringsten Zahlen an Kolonien wurden sofort wieder kloniert.

Nach insgesamt vier Klonierungsschritten wurden zwei Subklone etabliert, die in >90% aller bewachsenen Löcher beim Antikörperrnachweis positiv reagierten.

Die Subklone 10 C/2 und 1 D wurden absolut getrennt kultiviert; ihre Überstände wurden ebenfalls getrennt gesammelt und nach Zusatz von 0,1% Natriumazid bei 4°C im Kühlschrank oder bei - 20°C im Gefrierschrank aufbewahrt (CIOCCA et al., 1983).

3.1.2.5 Charakterisierung des Antikörpers

Es wurde von den Überständen beider Subklone je eine Antikörpertiterkurve (Abb. 12) erstellt und als Arbeitsverdünnung für die direkten EIAs jeweils die Verdünnung gewählt, die 70% der höchsten Extinktion entsprach.

3.1.2.5.1 Feststellung der Immunglobulinsubklasse

Für diesen Zweck wurde ein indirekter EIA verwendet: Die Mikrotiterplatte wurde mit dem T-2-BSA beschichtet, das zur Immunisierung verwendet worden war (100 µl einer Ver-

dünnung von 10 µg/ml in Carbonat/Bicarbonatpuffer). Nach Absättigen und Waschen wurden zwei Verdünnungen jedes Überstandes (100 µl einer 1:10 und 1:100 Verdünnung in PBS) bzw. Myelomkulturüberstand (als Nullwert) 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem Waschen wurden je 100 µl von Peroxidase-markiertem anti-Maus IgG1, IgG2a, IgG2b und IgG3 (1:1000 Verdünnung in PBS/1% FKS) (Miles Scientific, Bayer Diagnostika, München) wie oben inkubiert. Waschen, Substratzugabe und Stoppen der Reaktion erfolgten wie unter 3.1.2.1 beschrieben.

3.1.2.5.2 Ermittlung der Standardkurve

Für diesen Zweck wurde in einem kompetitiven direkten EIA (Abb. 9) untersucht, inwieweit T-2 Toxin die Bindung von HT-2 HRP an den Antikörper hemmt. Die Beschichtung und das Absättigen erfolgten wie unter 3.1.2.1 beschrieben. Nach einem Waschschrift wurden die unter 3.1.2.5 ermittelten Verdünnungen der Überstände (100 µl pro Kavität) dazupipettiert und 1 h inkubiert. Die Platte wurde gewaschen und pro Kavität 50 µl HT-2-HRP (1:500 in PBS/1% FKS) zusammen mit 50 µl Standardverdünnungen von T-2 Toxin (s. u.) bzw. PBS/10% Methanol (Leerwert) 1 h inkubiert.

Waschen, Substratzugabe und Stoppen der Reaktion erfolgten wie unter 3.1.2.1 beschrieben.

Für die Auswertung wurde die Extinktion des Leerwertes als maximale Extinktion gesetzt. Die Extinktion der Toxin enthaltenden Kavitäten wurden zu diesem Wert in Beziehung gesetzt und als Prozent der maximalen Extinktion gegen die Toxinkonzentrationen aufgetragen.

Als Nachweisgrenze wurde der Wert bei 80% der höchsten Extinktion festgesetzt.

Zur Ermittlung des Meßbereiches wurde das Toxin von 50 µg/ml bis 5 pg/ml getestet, danach wurden Konzentrationen von 10 µg/ml bis 3 ng/ml gewählt.

Diese Untersuchungen wurden insgesamt sechsmal durchgeführt

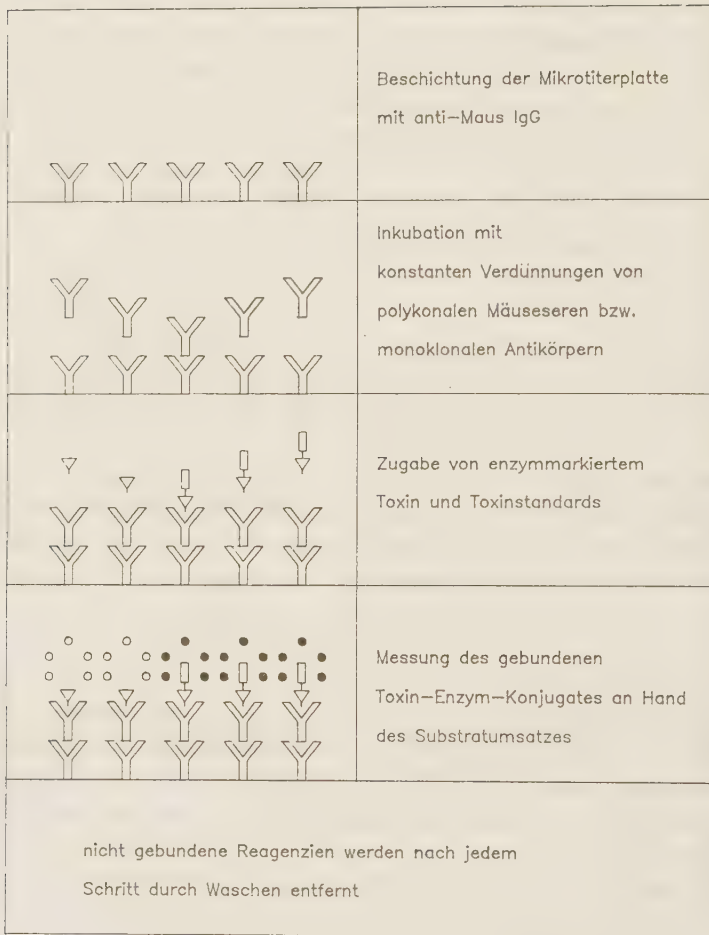


Abbildung 9: Prinzip des direkten kompetitiven
Enzymimmunoassays mit
Doppelantikörpertechnik
zum Nachweis von Toxin

und aus den erzielten Werten der Mittelwert gebildet.

3.1.2.5.3 Ermittlung der Spezifität

Zu diesem Zwecke wurden die Kreuzreaktionen relativ zu T-2 Toxin bestimmt. Es wurde analog zu 3.1.2.5.2 verfahren. An Stelle des T-2 Toxins wurden die 14 in Tab. 4 aufgeführten Trichothecene (Acetyl T-2, HT-2, Iso T-2, T-2 Triol, T-2 Tetraoltetraacetat, T-2 Tetraol, Roridin A, Diacetoxyscirpenol, 3 α -Acetyldiacetoxyscirpenol, Scirpentriol, Verrucarol, Neosolaniol, Nivalenol und Deoxynivalenol) im kompetitiven EIA eingesetzt und im Bereich von 50 μ g/ml bis 5 pg/ml getestet. Die Verdünnung der Toxine erfolgte in PBS/10% Methanol.

Es wurde für jedes Trichothecen eine Hemmkurve erstellt und die Toxinkonzentration bei 50% der maximalen Extinktion graphisch ermittelt. Die Relation zum entsprechenden Wert von T-2 Toxin wurde als % Kreuzreaktivität bezeichnet. Aus den Ergebnissen der insgesamt sechsmal durchgeführten Untersuchungen wurde der Mittelwert gebildet.

3.1.2.5.4 Verwendung von T-2-HRP anstelle von HT-2-HRP

In diesen Versuchen wurde T-2-HRP als homologes Enzymkonjugat im EIA eingesetzt, um zu untersuchen, ob sich T-2-HRP besser als HT-2-HRP an den monoklonalen Antikörper 1C4 bindet.

In analog zu 3.1.2.5.2 und 3.1.2.5.3 durchgeführten Anordnungen wurden Verdünnungen von T-2 Toxin, HT-2, Acetyl T-2 und T-2 Triol zusammen mit T-2-HRP (1:50000 in PBS/1% FKS) inkubiert.

Die Kreuzreaktionen relativ zu T-2 Toxin und die Nachweisgrenze für T-2 Toxin wurden ermittelt wie oben angegeben.

Tabelle 4: Seitenketten aller Trichothecene,
die zur Bestimmung der Spezifität des
anti-T-2 Toxin-Antikörpers eingesetzt wurden

Toxin	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆
T-2 Toxin	-OH	-OAc ^a	-OAc	-H	-OIsv ^b	-H
Acetyl T-2	-OAc	-OAc	-OAc	-H	-OIsv	-H
HT-2	-OH	-OH	-OAc	-H	-OIsv	-H
Iso T-2	-OAc	-OH	-OAc	-H	-OIsv	-H
T-2 Triol	-OH	-OH	-OH	-H	-OIsv	-H
T-2 Tetraol-						
tetraacetat	-OAc	-OAc	-OAc	-H	-OAc	-H
T-2 Tetraol	-OH	-OH	-OH	-H	-OH	-H
Diacetoxy-						
scirpenol	-OH	-OAc	-OAc	-H	-H	-H
3 α -Acetyldiacet-						
oxyscirpenol	-OAc	-OAc	-OAc	-H	-H	-H
Scirpentriol	-OH	-OH	-OH	-H	-H	-H
Verrucarol	-H	-OH	-H	-OH	-H	-H
Neosolaniol	-OH	-OAc	-OAc	-H	-OH	-H
Nivalenol	-OH	-OH	-OH	-OH	=O	
Deoxynivalenol	-OH	-H	-OH	-OH	=O	
Roridin A	-H	*	*	-H	-H	-H

^a -OAc: Acetylgruppe -OCOCH₃

^b -OIsv: Isovalerylgruppe -OCOCH₂CH(CH₃)₂

* makrozyklische Verbindung (siehe Abb. 5)

3.1.2.6 Produktion von Ascites

Makrophagenfrei wachsende Hybridome der beider Subklone 10C/2 und 1D wurden in einer Zahl von ca. 1×10^6 in 0,5 ml DMEM suspendiert und in die Bauchhöhle von BALB/c-Mäusen transplantiert, die 1-2 Tage vorher mit 0,5 ml inkomplettem Freund'schen Adjuvans vorbehandelt worden (MUELLER et al., 1986) waren.

Sobald sich eine fluktuierende Auftreibung der Bauchhöhle abzeichnete (nach ca. 2-3 Wochen), wurden die Tiere, wie oben beschrieben, getötet und im Durchschnitt 5 ml Ascitesflüssigkeit pro Tier durch Punktion der Bauchhöhle gewonnen.

Die Flüssigkeiten wurden für beide Subklone getrennt gesammelt, 1 h bei Raumtemperatur und 3 h bei 4°C inkubiert, und dann 30 min bei 4°C und 1700 x g zentrifugiert. Dann wurden die Ascitestiter analog zu 3.1.2.1 ermittelt. Zur Reinigung wurde der Ascites mit einem gleichen Volumen gesättigter Ammoniumsulfatlösung gefällt (GODING, 1980), 1 h im Eisbad inkubiert und zentrifugiert (30 min bei 4°C und 1700 x g). Das trockene Pellet wurde in PBS gelöst und auf das Ausgangsvolumen aufgefüllt. Nach Dialyse gegen 5 l PBS (zweimaliger Pufferwechsel), wurden die Proteingehalte bestimmt (LOWRY et al., 1951). Bis zur weiteren Verwendung wurden die Ascitesfraktionen bei -80°C eingefroren.

3.1.2.7 Charakterisierung des polyklonalen Serums der Maus, deren Milzzellen zum Hybridom 1C4 fusioniert wurden

In diesem Versuch wurden Affinität und Spezifität des Serums der Maus bestimmt, deren Milzzellen zum Hybridom 1C4 fusioniert worden waren, um zu prüfen, ob sich Unterschiede zu den Reaktionen des monoklonalen Antikörper 1C4 ergäben.

Zu diesem Zweck wurde die Antiserumverdünnung bei 70% der maximalen Extinktion im EIA (siehe 3.1.2.1) gewählt. Im

weiteren wurde vorgegangen wie unter 3.1.2.5.2 und 3.1.2.5.3 beschrieben, wobei Verdünnungen der Toxine T-2 Toxin, Acetyl T-2, HT-2, T-2 Triol, Iso T-2 und T-2 Tetraoltetraacetat zusammen mit HT-2-HRP (1:500 in PBS/1% FKS) inkubiert wurden.

3.1.3 Ergebnisse

Zur Herstellung monoklonaler Antikörper gegen T-2 Toxin wurden acht Mäuse nach dem angegebenen Schema jeweils mit insgesamt 350 µg T-2-BSA immunisiert. Bei den Vorbereitungen hierfür fiel auf, daß das von der Firma Sigma, Deisenhofen bezogene Produkt (T 9642) gemäß der Methode nach LOWRY et al. (1951) nur 60% der vom Hersteller angegebenen Proteinmenge enthielt.

Abgesehen von den ersten Stunden nach den intraperitonealen Injektionen konnten bei keiner der immunisierten Mäuse Störungen des Allgemeinbefindens festgestellt werden.

Alle immunisierten Mäuse wiesen spätestens bei der zwei Wochen nach der Restimulierung durchgeführten Untersuchung einen Antiserumtiter von mindestens 1:20000 auf, während bei den nicht immunisierten Kontrollmäusen keine spezifischen Antikörper gefunden wurden.

Für diese Überprüfung der Immunantwort wurde ein direkter EIA mit einer Doppelantikörpertechnik in Anlehnung an ARAKAWA et al. (1981) angewandt, da bei diesem System die im Hause bereits vorhandenen Toxin-Enzym-Konjugate (HT-2-HRP und T-2-HRP) verwendet werden konnten.

Die Vorbereitungen zu den Fusionen (Tab. 3) gestalteten sich problemlos, insbesondere die Kultivierung der Myelomzellen (X63-Ag8.653) und die Vorbereitung der Platten mit den Peritonealmakrophagen als "Feeder-Layer".

Bei der Präparation der Milzen fielen die oft großflächigen Verklebungen zwischen Milzkapsel und anderen Organen auf, die die Freilegung der Milzen behinderten.

Die stichprobenartigen Kontrollen der nach der Fusion von

ca. 10^8 Milz- und 10^7 Myelomzellen ausgesäten Zellkulturen ergaben keinen Hinweis auf Beeinträchtigung der Sterilität. Obwohl am Ende der ersten Woche nach der Fusion die unfusionierten Myelomzellen in der Regel abgestorben waren, wurde noch bis zum Ende der zweiten Woche die HAT-Selektion fortgeführt. Etwa zu diesem Zeitpunkt war auch schon erstes Hybridomzellwachstum mikroskopisch erkennbar, allerdings zumeist überlagert von Detritus abgestorbener und absterbender Myelomzellen. Bis zum Ende der zweiten Woche waren diese Zelltrümmer zumeist vom "Feeder-Layer" phagozytiert worden.

In dieser Phase, in der auch die Umstellung vom HAT-Medium auf HT-Medium erfolgte, wurden dann die einzelnen Kavitäten auf Anwesenheit von anti-T-2 Toxin Antikörpern getestet. (Es wurde der gleiche EIA wie zum Nachweis von Antikörper aus Serum verwendet, da das Zellkulturmedium nachgewiesenermaßen keinen Einfluß auf die Resultate hat.) Von 440 Überständen der zweiten Fusion reagierten zwar 156 im EIA positiv, doch waren nur in 16 dieser Kavitäten auch Hybridome erkennbar.

Die im Verlauf der nächsten Tage vorgenommenen Manipulationen, wie mehrmaliger Ersatz des alten Mediums durch frisches oder Umsetzen der Hybridome in andere "Feeder-Layer"-Platten hatten zur Folge, daß, bis auf eine Ausnahme, die Extinktionen der Überstände im EIA immer niedriger wurden. Schließlich blieb eine positive Kultur übrig, bei der die Extinktion während der verschiedenen Prüfungen stets annähernd gleich hoch (ca. 1,0) war. Diese Kultur wurde wegen der Lage des Ursprungsloches auf der Fusionsplatte als 1C4 bezeichnet.

Da bei den anderen sieben Fusionen schon in früheren Stadien keine positive Kavitäten (Antikörpernachweis und Hybridomwachstum) gefunden werden konnten, wurden diese nicht weiter verfolgt (Tab. 5).

Schon bei der ersten mikroskopischen Untersuchung der Kultur 1C4 in der Kavität der Ursprungsplatte, unmittelbar

Tabelle 5: Übersicht über die durchgeführten Fusionen
zur Herstellung von monoklonalen Antikörpern
gegen T-2 Toxin

Fusion	Serumtiter 1:	Anzahl der gewachsenen Hybridome	Fusions- frequenz* (%)	positive Klone
1	20000	32	7,2	-
2	20000	48	11,0	1
3	20000	45	17,0	-
4	25000	46	10,4	-
5	70000	35	7,0	-
6	35000	47	9,4	-
7	25000	49	7,8	-
8	30000	35	7,0	-

* $(\text{Anzahl bewachsener Löcher} / \text{Anzahl ausgesäter Löcher}) \times 100$

nach dem ersten Test waren mehrere gleichgroße Klone gefunden worden. Daher wurde sobald als möglich kloniert, um ein Überwachsen des Antikörperproduzenten durch Nicht-Produzenten zu verhindern. Nach der ersten Klonierung, bei der durchschnittlich 10, 3 bzw. 0,5 Zellen pro Kavität einer 96-Loch-Platte mit "Feeder-Layer" verbraucht worden waren, konnte nur in drei bewachsenen Kavitäten eine positive Reaktion im EIA festgestellt werden. In die drei Kavitäten waren jeweils etwa zehn Zellen der Kultur 1C4 ausgesät worden. Die Zahl der positiven Kavitäten nahm dann mit jeder Klonierung zu, so daß schließlich (nach der vierten Klonierung) in >90% der bewachsenen Löcher positive Reaktionen im EIA festgestellt wurden. Von diesen wurden zwei Subklone (10C/2 und 1D) etabliert und getrennt kultiviert.

Die Zellkulturüberstände wurden getrennt gesammelt und nach Zusatz von 0,1% Natriumazid im Kühlschrank aufbewahrt.

Die Charakterisierung des Antikörpers erfolgte getrennt für die Überstände beider Subklone, wobei für den Einsatz in den direkten kompetitiven EIAs Verdünnungen von 1:50 gewählt wurden.

Dem Ergebnis des indirekten EIA zur Ermittlung der IgG-Subklasse - hier kam es nur auf eine JA-NEIN-Entscheidung an, deshalb konnten andere Verdünnungen (1:10 und 1:100 gewählt werden - war zu entnehmen, daß die Antikörper in den jeweiligen Überständen zur IgG1-Subklasse gehörten. Mit Peroxidase-markierten anti-Maus IgG2a, IgG2b und IgG3 zeigten sich keine Reaktionen.

Im direkten kompetitiven EIA unter Verwendung des monoklonalen Antikörpers ergab sich für T-2 Toxin eine Nachweisgrenze von 50 ng/ml (Mittelwert aus sechs Parallelansätzen). Diese bezieht sich auf die Toxinkonzentration bei 80% der höchsten Extinktion bei 490 nm. Im Hinblick auf die Bestimmung der Spezifität des Antikörpers wurde der Wert für 50% der höchsten Extinktion - er entspricht 50% Hemmung der Reaktion zwischen HT-2-HRP und Antikörper - bei 350 ng/ml bzw. 0,751 μ mol/l ermittelt (Abb. 10, Tab. 6).

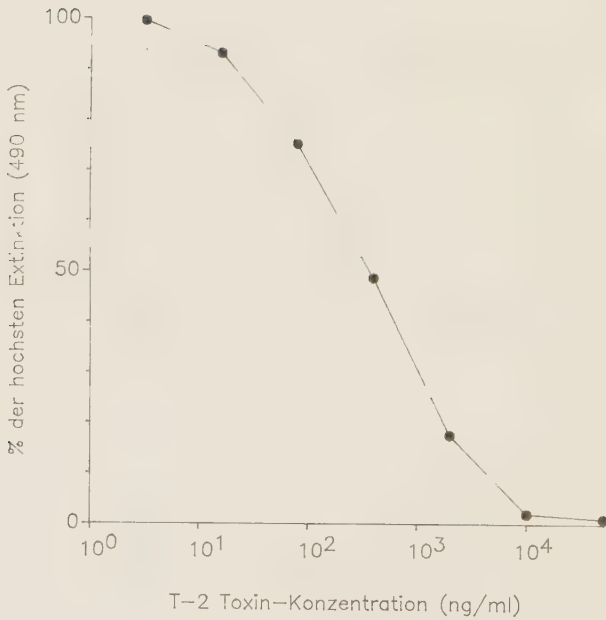


Abbildung 10: Standardkurve im direkten kompetitiven EIA
zum Nachweis von T-2 Toxin unter Verwendung
des monoklonalen anti-T-2 Toxin Antikörpers 1C4

Von den 14 in Konzentrationen von 50 µg/ml bis 5 pg/ml zur Ermittlung der Spezifität eingesetzten Trichothecenen (Acetyl T-2, HT-2, Iso T-2, T-2 Triol, T-2 Tetraoltetraacetat, T-2 Tetraol, Roridin A, Diacetoxyscirpenol, 3α-Acetyldiacetoxyscirpenol, Scirpentriol, Verrucarol, Neosolaniol, Nivalenol und Deoxynivalenol) wies Acetyl T-2 mit 82,8% die höchste Kreuzreaktivität^{**}) auf. Deutlich schwächer waren die Reaktionen mit Iso T-2 (30,0%), HT-2 (29,2%) und T-2 Triol (13,3%), mit T-2 Tetraoltetraacetat betrug sie nur noch 1,0% (Abb. 11, Tab. 6). Alle anderen geprüften Trichothecene wiesen im getesteten Bereich keine 50% Hemmung auf.

Das heterologe Enzymkonjugat HT-2-HRP ist offensichtlich zur Charakterisierung des Antikörpers in den Hybridomüberständen gleich gut geeignet wie das homologe T-2-HRP. Es ergaben sich nämlich keinerlei Unterschiede bezüglich der Nachweisgrenze für T-2 Toxin und der Kreuzreaktivität mit Acetyl T-2, HT-2 und T-2 Triol im EIA.

Bei allen bisher aufgeführten Untersuchungen zeigten die Überstände beider Subklone absolut identische Reaktionen. Es kann infolgedessen davon ausgegangen werden, daß beide denselben anti-T-2 Toxin Antikörper, 1C4, bilden.

Bei der Verwendung des polyklonalen Serums der Maus, deren Milzzellen zum Hybridom 1C4 fusioniert worden waren, in einer Verdünnung von 1:2000 im EIA ergab sich folgendes (Tab. 7): Das Antiserum wies eine 50% Hemmung für T-2 Toxin bei 5,79 nmol/l auf. Acetyl T-2 und Iso T-2 reagierten um ein Vielfaches spezifischer mit dem Antiserum als T-2 Toxin. HT-2 wies 23,2% relative Kreuzreaktivität auf, T-2 Triol und T-2 Tetraoltetraacetat nur 0,22 bzw. 0,25%.

Durch intraperitoneale Transplantation von ca. 1×10^6 Hybridomen beider Subklone konnten bei den meisten Tieren nach etwa 2-3 Wochen im Durchschnitt 5 ml Ascitesflüssigkeit ge-

^{**}) Die von den Werten in der Publikation (HACK et al., 1987) leicht abweichenden Prozentzahlen sind begründet in verschiedenen Einheiten für die Toxinkonzentrationen bei 50% Hemmung (µmol/l statt µg/ml)

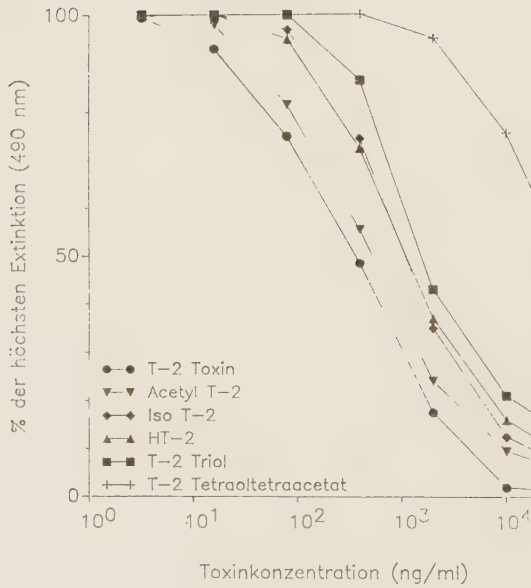


Abbildung 11: Einfluß von T-2 Toxin und anderen Trichothecenen auf die Bindung von HT-2-HRP an den monoklonalen anti-T-2 Toxin Antikörper 1C4

Tabelle 6: Spezifität des monoklonalen anti-T-2 Toxin
Antikörpers 1C4

Toxin	50% Hemmung ^a	Kreuzreaktivität ^b
	($\mu\text{mol/l}$)	relativ zu T-2 Toxin (%)
T-2 Toxin	0,751	100
Acetyl T-2	0,907	82,8
HT-2	2,57	29,2
Iso T-2	2,50	30,0
T-2 Triol	5,64	13,3
T-2 Tetraoltetraacetat	75,1	1,0

^a Konzentration von T-2 Toxin für 50% Hemmung ($\mu\text{mol/l}$)

^b (Konzentration von T-2 Toxin für 50% Hemmung/
Konzentration betreffendes Toxin für 50% Hemmung) $\times 100$

Tabelle 7: Spezifität des Antiserums der Maus, deren
Milzzellen zum Hybridom 1C4 fusioniert wurden

Toxin	50% Hemmung ^a	Kreuzreaktivität ^b
	(nmol/l)	relativ zu T-2 Toxin (%)
T-2 Toxin	5,79	100
Acetyl T-2	0,00295	>>100
Iso T-2	0,0686	>>100
HT-2	24,98	23,2
T-2 Triol	2617,8	0,22
T-2 Tetraol- tetraacetat	2359,8	0,25

^a und ^b siehe Tab. 6

wonnen werden.

Diese trübe, gelbliche und mehr oder weniger stark gerinnende Flüssigkeit enthielt viele Hybridomzellen. In der Bauchhöhle dieser Mäuse fanden sich zahlreiche stecknadelkopf- bis erbsengroße schwammig-weiche Tumoren, während bei Tieren, die nach vier Wochen keinen Ascites entwickelt hatten, weder Hybridomzellen noch die erwähnten Tumoren gefunden wurden.

Die Ascitesflüssigkeiten der beiden Subklone 10C/2 und 1D wiesen Titer von $1:5,0 \times 10^5$ bzw. $1:6,0 \times 10^4$ auf (Abb. 12) und enthielten 40 mg/ml bzw. 18 mg/ml Protein. Im Vergleich zu den Titern der Überstände, die - aus Abb. 12 ermittelt - für Subklon 10C/2 1:250 und für Subklon 1D 1:170 betrugen, entspricht dies einer Anreicherung um das 2000fache bzw. mehr als das 300fache. (Auch hier war Titer als die Verdünnung definiert, die im EIA einer Extinktion von 0,3 entsprach.)

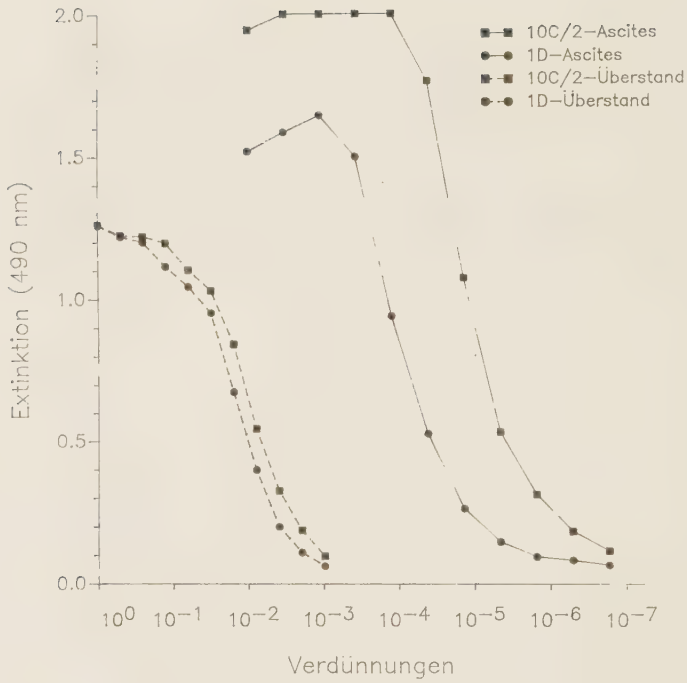


Abbildung 12: Verdünnungskurven des in vitro und in vivo von den Subklonen 10C/2 und 1D produzierten anti-T-2 Toxin Antikörpers 1C4

3.2 Herstellung und Charakterisierung monoklonaler Antikörper gegen Roridin A ^{*)}

3.2.1 Material

Reagenzien

Die Trichothecene Roridin A, Verrucaridin A, Verrucarol, Diacetylverrucarol, T-2 Toxin, T-2 Tetraol, Diacetoxyscirpenol, 15-Acetoxyscirpenol und Deoxynivalenol wurden von Sigma, Deisenhofen, bezogen; Neosolaniol, Nivalenol und Fusarenon X von Wako Chemicals, Neuss.

Die nicht im Handel erhältlichen makrozyklischen Trichothecene Satratoxin G, Satratoxin H und Roridin J kamen vom Institut für Biochemie der Universität Mainz.

Absorbiertes Kaninchen anti-Maus Immunglobulin (Ig) wurde von Dakopatts, Hamburg, affinitätschromatographisch gereinigtes anti-Maus IgG von Sigma, Deisenhofen bezogen.

Freund'sches Adjuvans (komplett und inkomplett) kam von Gibco-BRL, Eggenstein.

Das zur Immunisierung verwendete Roridin A-Humanserumalbumin-Konjugat (RA-HSA) wie auch das Roridin A-Peroxidase-Konjugat (RA-HRP) wurde am Lehrstuhl von MÄRTLBAUER (1988) hergestellt.

Alle anderen nicht besonders gekennzeichneten Chemikalien und Lösungsmittel wurden von Merck, Darmstadt, in pro analysi-Qualität bezogen.

Substratlösung (GALLATI und PRACHT, 1985):

Kaliumcitratpuffer 0,2 mol/l, pH 3,9 + 1 mmol/l 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (Sigma, Deisenhofen) + 3 mmol/l H₂O₂

*) Da die Abschnitte "Material" und "Methodik" mit jenen des vorhergehenden Kapitels weitgehend übereinstimmen, wurden hier nur die davon abweichenden bzw. zum Verständnis unbedingt erforderlichen Angaben näher beschrieben.

HIAT-Medium (FEIT et al., 1984):

HAT-Medium + 10 I.E./l sterilfiltriertes Insulin (Sigma, Deisenhofen)

Sonstige Lösungen und Medien sowie Versuchstiere, Geräte und Kunststoffmaterialien entsprachen jenen in Abschnitt 3.1.1.

3.2.2 Methodik

3.2.2.1 Immunisierung der Mäuse

Drei weibliche BALB/c-Mäuse wurden am Tag 1, 21 und 50 mit jeweils 50 µg RA-HSA intraperitoneal grundimmunisiert. Für die erste Injektion wurde das Antigen gelöst in 100 µl sterilem PBS in komplettem, für die beiden folgenden Injektionen in inkomplettem Freund'schen Adjuvans im Verhältnis 1+2 emulgiert.

Zur Bestimmung der anti-Roridin A Serumtiter wurde den Tieren entsprechend Abschnitt 3.1.2.1 zwei Wochen nach jeder Immunisierung ca. 15 Tropfen Blut entnommen und aufbereitet.

Für den Antikörpernachweis wurde auch hier die Doppelantikörpertechnik (Abb. 8) verwendet:

Nach Beschichtung 3 h bei 37°C oder über Nacht bei Raumtemperatur mit jeweils 100 µl anti-Maus IgG pro Kavität (10 µg/ml in Carbonat/Bicarbonatpuffer), Absättigen mit 150 µl PBS/3% FKS (30 min) und Waschen, wurden die Antiseren zugegeben (100 µl einer Verdünnung von 1:100 in PBS) und in PBS, HT bzw. HIAT 1+3 weiterverdünnt. Nach einstündiger Inkubation und Waschen erfolgte die Zugabe von RA-HRP (100 µl einer Verdünnung von 1:10000 in PBS/1% FKS). Eine Stunde später wurden die bei Raumtemperatur inkubierten Platten gewaschen und 100 µl Substratlösung in die einzelnen Kavitäten pipettiert. Nach ausreichender Farbentwicklung (ca. 5

min) wurde die Reaktion mit 100 µl Schwefelsäure (1 mol/l) gestoppt. Die Messung erfolgte bei 450 nm im ELISA-Auswertegerät.

3.2.2.2 Zellkulturbedingungen und Fusion

Die allgemeinen Zellkulturbedingungen wie auch die mittel- und kurzfristigen Vorbereitungen zur Fusion entsprachen jenen unter 3.1.2.2 (Tab. 3). Allerdings bestand die letzte Injektion 3 Tage vor der Fusion (90. Versuchstag) nur aus 75 µg Antigen (RA-HSA) in 300 µl PBS ohne Adjuvans. Die Milz- und Myelomzellen wurden auf ein Verhältnis von 5:1 eingestellt und nach dem Schema von FAZEKAS DE ST. GROTH und SCHEIDEGGER (1980) fusioniert:

0. - 1. min	1 ml PEG unter Schwenken zutropfen,
1. - 2. min	einwirken lassen, leicht bewegen,
2. - 2,5. min	1 ml PBS unter Schwenken zutropfen,
2,5. - 3. min	3 ml PBS unter Schwenken zutropfen,
3. - 4. min	16 ml PBS unter Schwenken dazugeben.

Die Reaktionsmischung wurde unmittelbar nach der Fusion bei 120 x g für 5 min zentrifugiert und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert (FAZEKAS DE ST. GROTH und SCHEIDEGGER, 1980).

Danach wurde der Überstand dekantiert, das Pellet vorsichtig in 15 ml HIAT-Medium suspendiert und in die Kavitäten der fünf mit "Feeder-Layer" vorbereitete 96-Loch-Platten ausgesät; in einige Kavitäten wurden zur Selektionskontrolle nur unfusionierte Myelomzellen verbracht.

Nachdem alle Kavitäten mit 100 µl HIAT-Medium aufgefüllt worden waren, wurde in der üblichen, oben beschriebenen Art und Weise (3.1.2.2) weiterverfahren.

3.2.2.3 Nachweis antikörperproduzierender Hybridome

Am Ende der zweiten Woche wurden die Fusionsplatten durch Entnahme von 100 μ l Zellkulturüberstand mit der unter 3.2.2.1 beschriebenen Doppelantikörpertechnik auf Vorhandensein von anti-Roridin A Antikörper getestet. Abweichend davon wurde allerdings zur Beschichtung der EIA-Platte anti-Maus Ig verwendet (100 μ l einer 1:1000 Verdünnung, d.h. 10 μ g/ml), um nicht nur auf IgG-Antikörper zu selektieren.

Außerdem wurde die Zeit für eine ausreichende Farbentwicklung auf 20 min festgesetzt.

Positive Kavitäten wurden mikroskopisch untersucht und mit frischem HT-Medium aufgefüllt. Einige Tage später wurden diese Kulturen wieder getestet und positive weitergezogen. Nach mehrmaligem Mediumwechsel und einem Umsetzen blieben drei positive Kulturen übrig, die nach der Lage der Ursprungslöcher auf den Fusionsplatten als 4H10, 3E1 und 5G11 bezeichnet wurden.

3.2.2.4 Klonierung

Die Klonierungen der Kulturen erfolgten wie bei der Produktion von monoklonalen Antikörpern gegen T-2 Toxin beschrieben (3.1.2.4).

Von jedem der drei Hybridome wurden zwei Subklone etabliert und getrennt kultiviert; die Überstände der jeweiligen beiden Subklone aber wurden "gepoolt".

3.2.2.5 Charakterisierung der Antikörper

Es wurden Titerkurven von den Überständen erstellt und als Arbeitsverdünnung für die direkten EIAs jeweils die Verdünnung gewählt, die 70% der höchsten Extinktion entsprach (Abb. 18).

3.2.2.5.1 Feststellung der Immunglobulinklasse und -subklasse

Die Bestimmung erfolgte mittels indirektem EIA analog zu 3.1.2.5.1. Allerdings wurde zur Beschichtung RA-HSA (100 μ l einer Verdünnung von 10 μ g/ml in Carbonat/Bicarbonatpuffer) verwendet und zusätzlich zu Peroxidase-markierten anti-Maus IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3 auch anti-Maus IgM (Miles Scientific, Bayer Diagnostika, München) (100 μ l einer Verdünnung von 1:1000 in PBS/1% FKS) eingesetzt.

Da alle drei Hybridome als IgG1-Produzenten identifiziert werden konnten, wurden die folgenden Untersuchungen mit anti-Maus IgG als Beschichtung durchgeführt.

3.2.2.5.2 Ermittlung der Standardkurven

Für diesen Zweck wurde in einem kompetitiven EIA (Abb. 9) untersucht, inwieweit Roridin A die Bindung von RA-HRP an die drei monoklonalen Antikörper hemmt.

Nach Beschichten der Kavitäten mit anti-Maus IgG, Absättigen und Waschen (wie unter 3.2.2.1) wurden je 100 μ l der Arbeitsverdünnung der drei Antikörper 1 h inkubiert. Nach einem Waschschrift wurden jeweils 50 μ l RA-HRP (1:5000 in PBS/1% FKS) zusammen mit jeweils 50 μ l Roridin A-Standardverdünnungen bzw. PBS/10% Methanol (Leerwert) 1 h inkubiert. Die weiteren Schritte erfolgten in der üblichen Art.

Zur Auswertung wurden die Extinktionen der Roridin A enthaltenden Kavitäten in Beziehung gesetzt zur Extinktion des Leerwerts und als Prozent der höchsten Extinktion gegen die Toxinkonzentrationen aufgetragen.

Als Nachweisgrenze für Roridin A wurde die Konzentration bei 80% der maximalen Extinktion festgelegt.

Zur Ermittlung der Meßbereiche wurde Roridin A von 50 μ g/ml bis 5 pg/ml getestet, danach wurde für Antikörper 5G11 und

4H10 der Bereich von 400 ng/ml bis 0,128 ng/ml und für Antikörper 3E1 der Bereich von 10 µg/ml bis 0,0032 µg/ml gewählt.

3.2.2.5.3 Ermittlung der Spezifität

Zu diesem Zweck wurden die Kreuzreaktionen relativ zu Roridin A bestimmt. Es wurde analog zu 3.1.2.5.3 verfahren. Anstelle des Roridin A wurden 10 nicht-makrozyklische Trichothecene (Tab. 8) und vier makrozyklische Trichothecene (Abb. 30) im kompetitiven EIA eingesetzt. Die im Handel erhältlichen Toxine (siehe 3.2.1) wurden im Bereich von 50 µg/ml bis 5 pg/ml getestet, die nur in µg-Mengen zur Verfügung stehenden makrozyklischen Trichothecene Satratoxin G, Satratoxin H und Roridin J im Bereich von 250 ng/ml bis 2,6 pg/ml.

Zur Auswertung wurden für jedes Toxin eine Standardkurve erstellt und die Toxinkonzentrationen bei 50% der höchsten Extinktion graphisch ermittelt. Die Relation zum entsprechenden Wert von Roridin A wurde als % Kreuzreaktivität bezeichnet.

3.2.2.5.4 Bestimmung der Affinitätskonstanten

Die Affinitätskonstanten wurden nach FRIGUET et al. (1985) ermittelt. Hierzu wurden willkürlich gewählte Verdünnungen von ammoniumsulfatgefälltem Zellkulturüberstand (1:5000 bei Antikörper 5G11 und 1:100 bei Antikörper 4H10) mit gleichen Volumina verschiedener Roridin A-Standardkonzentrationen (3,2 bis 5000 ng/ml) über Nacht bei Raumtemperatur in Glasröhrchen vorinkubiert. Jeweils 100 µl dieser Reaktionsmischungen wurden auf eine mit RA-HSA beschichtete, abgesättigte und gewaschene Platte übertragen und 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einem Waschschrift wurden jeweils 100 µl anti-Maus Ig-HRP (1:1000 in PBS/1% FKS) (Dako-

Tabelle 8: Seitenketten der nicht-makrozyklischen
Trichothecene, die zur Bestimmung der Spezifität
der anti-Roridin A Antikörper eingesetzt wurden

Toxin	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆
T-2 Toxin	-OH	-OAc ^a	-OAc	-H	-OIsv ^b	-H
T-2 Tetraol	-OH	-OH	-OH	-H	-OH	-H
Neosolaniol	-OH	-OAc	-OAc	-H	-OH	-H
Nivalenol	-OH	-OH	-OH	-OH		=O
Deoxynivalenol	-OH	-H	-OH	-OH		=O
Fusarenon X	-OH	-OAc	-OH	-OH		=O
Diacetoxy-						
scirpenol	-OH	-OAc	-OAc	-H	-H	-H
15-Acetoxy-						
scirpenol	-OH	-OH	-OAc	-H	-H	-H
Verrucarol	-H	-OH	-OH	-H	-H	-H
Diacetyl-						
verrucarol	-H	-OAc	-OAc	-H	-H	-H

^a -OAc: Acetylgruppe $-\text{OCOCH}_3$

^b -OIsv: Isovalerylgruppe $-\text{OCOCH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$

patts, Hamburg) dazugegeben und 1 h inkubiert. Danach wurde dieser indirekte EIA wie üblich durchgeführt.

Zur Auswertung wurde der reziproke Wert des gebundenen Antikörpers ($1/v$) gegen den reziproken Wert der eingesetzten Toxinkonzentration ($1/a_0$) in l/Mol in einem Koordinatensystem aufgetragen. Sofern die Konzentration an Antigen deutlich höher ist als die Konzentration des Antikörpers, ist v zu ermitteln aus $A_0/A_0 - A$, wobei A_0 die Absorption des Antikörpers ohne Toxinzusatz und A die Absorption bei der jeweiligen Toxinkonzentration im Gleichgewichtszustand mit dem Antikörper ist. Die Steigung der durch diese Punkte festgelegten Regressionsgeraden entspricht der Dissoziationskonstanten K_D .

3.2.2.6 Produktion von Ascites

BALB/c-Mäusen, vorbehandelt wie unter 3.1.2.6 beschrieben, wurden jeweils 1×10^6 Hybridome, suspendiert in 0,5 ml DMEM, intraperitoneal transplantiert. Zur Transplantation wurde bei jedem der drei Klone eine Mischung der entsprechenden beiden Subklone verwendet.

Während bei den Klonen 5G11 und 3E1 genau so verfahren wurde, wie unter 3.1.2.6 beschrieben, wurde bei Klon 4H10 eine andere Methode gewählt:

Der Ascites wurde bei diesen Mäusen unter Äthernarkose durch Punktion mit einer sterilen Kanüle (0,9x40 mm) gewonnen (jeweils ca. 2-3 ml). Bei manchen Tieren wurde bis zu viermal punktiert. Erst wenn sich kein Ascites mehr gewinnen ließ, wurden die Tiere getötet. Von den getrennt gesammelten Punktaten wurden die Titer bestimmt. Danach wurden die Punktate vereinigt und der Ascites aufbereitet, getestet und aufbewahrt wie unter 3.1.2.6 beschrieben.

3.2.2.7 Charakterisierung der polyklonalen Seren der Mäuse, deren Milzzellen zu den Hybridomen 4H10, 5G11 und 3E1 fusioniert wurden

In dieser Versuchsanordnung wurden Affinität und Spezifität der Seren der beiden Mäuse ermittelt, deren Milzzellen zu den drei Hybridomen fusioniert wurden (Maus II: Hybridom 4H10; Maus III: Hybridome 5G11 und 3E1). Es sollte überprüft werden, ob sich Unterschiede zu den Reaktionen der monoklonalen Antikörper ergäben.

Von beiden Seren wurden die Verdünnungen bei 70% der maximalen Extinktion im EIA gewählt. Im weiteren wurde wie unter 3.2.2.5.2 und 3.2.2.5.3 vorgegangen, wobei Verdünnungen von Roridin A, Verrucaridin A, Diacetylverrucarol und Verrucarol zusammen mit RA-HRP (1:5000 in PBS/1% FKS) inkubiert wurde.

3.2.3 Ergebnisse

Alle drei nach dem angegebenen Schema mit 225 µg RA-HSA immunisierten Mäuse wiesen schon beim ersten Test auf Antikörperproduktion zwei Wochen nach der ersten Injektion des Immunogens Serumtiter von 1:1000 auf, die durch die folgenden Injektionen auf mehr als 1:20000 gesteigert werden konnten und dann konstant blieben. Die Negativkontrolle - ein Gemisch von Seren nicht-immunisierter BALB/c-Mäuse - erbrachte keinen anti-Roridin A Titer, d.h. sie zeigte im entsprechenden EIA eine Extinktion von weniger als 0,3. Immunisierung und Blutentnahmen verliefen wie bei der Herstellung monoklonaler Antikörper gegen T-2 Toxin problemlos, lediglich unmittelbar nach den intraperitonealen Injektionen zeigten die Tiere kurzzeitig Störungen des Allgemeinbefindens. Die Vorbereitungen zu den Fusionen und die drei Fusionen selbst verliefen ohne Besonderheiten. Bei den zwei Wochen danach vorgenommenen Tests auf Anti-

körperproduktion reagierten bei Fusion I keine, bei Fusion II vier und bei Fusion III 74 Kavitäten positiv im EIA. Bei der mikroskopischen Untersuchung zeigte bei Fusion II nur eine EIA-positive Kavität Hybridomwachstum, bei Fusion III waren es 59. Nach mehrmaligem Mediumwechsel und einem Umsetzen blieben insgesamt drei Hybridome übrig, - bei Fusion II eines, bei Fusion III zwei - die im EIA positiv reagierten. Diese wurden nach ihrer Lage auf den Fusionsplatten als 4H10, 3E1 (aus Fusion II) und 5G11 (aus Fusion III) bezeichnet.

Die Klonierung der Hybridome 4H10 und 3E1 verlief problemlos, so daß diese nach drei Klonierungen mit jeweils zwei Subklonen monoklonal kultiviert werden konnten. Demgegenüber mußte das Hybridom 5G11 sechsmal kloniert werden, da vorher immer wieder antikörpernegative Varianten auftauchten. Auch hier wurden dann zwei Subklone weitergezogen. Die Überstände der jeweiligen Subklone wurden auf Grund der Erfahrungen bei der Herstellung monoklonaler Antikörper gegen T-2 Toxin gepoolt und als Antikörper 4H10, 3E1 bzw. 5G11 getestet.

Da die Nachweise bis dahin nur mit anti-Maus Ig im EIA durchgeführt worden waren, mußten zur Charakterisierung der Antikörper Ig-Klasse und -Subklasse festgestellt werden. Hierbei erwiesen sich alle drei Hybridome als IgG1-Produzenten, so daß für die folgenden Untersuchungen anti-Maus IgG zur Beschichtung für den EIA verwendet wurde.

Mit Arbeitsverdünnungen der jeweiligen Überstände wurden in kompetitiven EIAs mit freiem Roridin A und RA-HRP unterschiedliche Standardkurven ermittelt (Abb. 13). Die bei 80% der höchsten Extinktion festgelegten Nachweisgrenzen lauteten 0,4 ng/ml (0,02 ng/Ansatz) für Antikörper 5G11, 1,8 ng/ml (0,09 ng/Ansatz) für Antikörper 4H10 bzw. 110 ng/ml (5,5 ng/Ansatz) für Antikörper 3E1.

Im Hinblick auf die Bestimmung der Spezifität der drei Antikörper wurden die jeweiligen Werte für 50% Hemmung

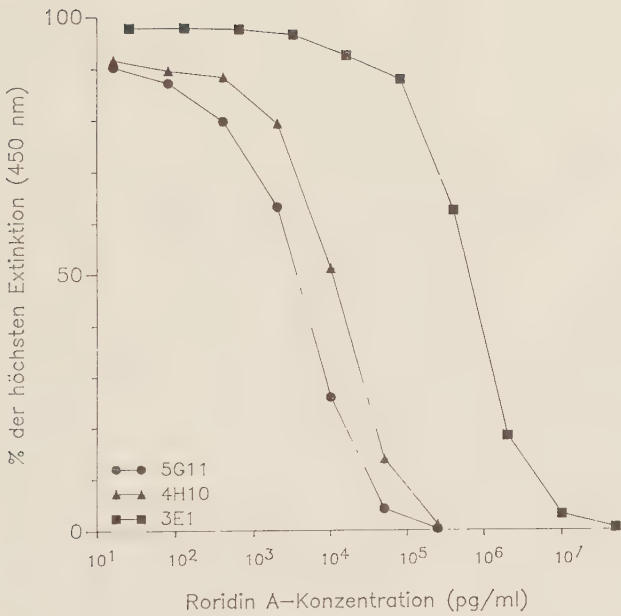


Abbildung 13: Standardkurven im direkten kompetitiven EIA zum Nachweis von Roridin A unter Verwendung der monoklonalen anti-Roridin A Antikörper 5G11, 4H10 und 3E1

ermittelt: 3,7 ng/ml (0,007 μ mol/l) für Antikörper 5G11, 8,5 ng/ml (0,016 μ mol/l) für Antikörper 4H10 bzw. 600 ng/ml (1,127 μ mol/l) für Antikörper 3E1.

Bei der Ermittlung der Spezifität der einzelnen Antikörper zeigte sich, daß alle drei monoklonalen Antikörper am stärksten mit Roridin A und den getesteten makrozyklischen Trichothecenen reagierten. Allerdings waren die Kreuzreaktivitäten gegenüber den einzelnen makrozyklischen Trichothecenen in Abhängigkeit vom jeweiligen Antikörper unterschiedlich. So wies Antikörper 5G11 mit Roridin J eine Kreuzreaktivität von 43,6 % auf, Antikörper 4H10 aber nur 6,3 %. Umgekehrt lagen die Verhältnisse bei Verrucarín A mit einer Kreuzreaktivität von 64,0% für Antikörper 4H10 und einer solchen von nur 16,7% für Antikörper 5G11. Am stärksten mit Verrucarín A reagierte Antikörper 3E1 (89,8 %) (Abb. 14, 15 und 16). Ergebnisse über die Reaktivität dieses Antikörpers mit Roridin J können allerdings nicht zum Vergleich herangezogen werden, da die nicht im Handel erhältlichen makrozyklischen Trichothecene Roridin J, Satratoxin G und H nur in begrenztem Umfang zur Verfügung standen und aus ökonomischen Gründen nicht eingesetzt wurden. Es war nämlich auf Grund der bei Roridin A erzielten Resultate nicht zu erwarten, daß im getesteten Bereich von 250 ng/ml bis 2,6 pg/ml eine 50% Hemmung der Reaktion zwischen Antikörper 3E1 und RA-HRP erreicht werden würde. Von den nicht-makrozyklischen Trichothecenen (T-2 Toxin, T-2 Tetraol, Neosolaniol, Nivalenol, Deoxynivalenol, Fusarenon X, Diacetoxyscirpenol, 15-Acetoxyscirpenol, Verrucarol, Diacetylverrucarol) reagierte mit Antikörper 5G11 nur Verrucarol und Diacetylverrucarol, mit Antikörper 4H10 zusätzlich noch Diacetoxyscirpenol und 15-Acetoxyscirpenol - allerdings waren die Kreuzreaktivitäten relativ zu Roridin A nur schwach ausgeprägt (<1%) (Tab. 9 und 10). Der Antikörper 3E1 wies nur eine Kreuzreaktivität mit Diacetylverrucarol auf, diese war jedoch mit 5,1% deutlich höher als bei den beiden anderen Antikörpern (Tab. 11).

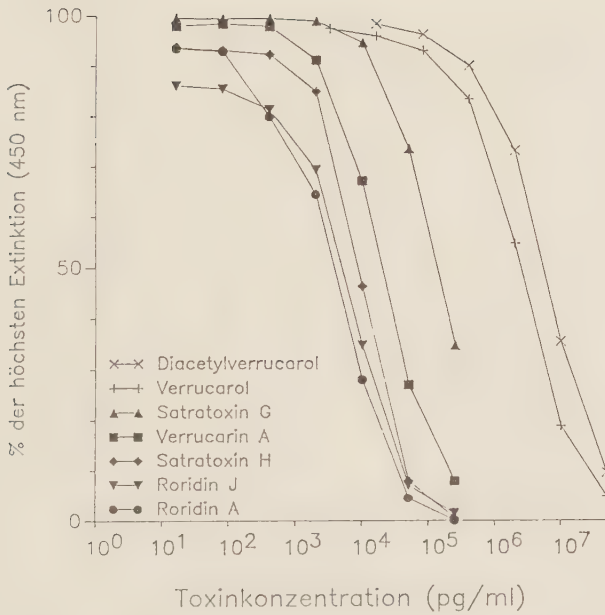


Abbildung 14: Einfluß von Roridin A und anderen Trichothecenen auf die Bindung von RA-HRP an den monoklonalen anti-Roridin A Antikörper 5G11

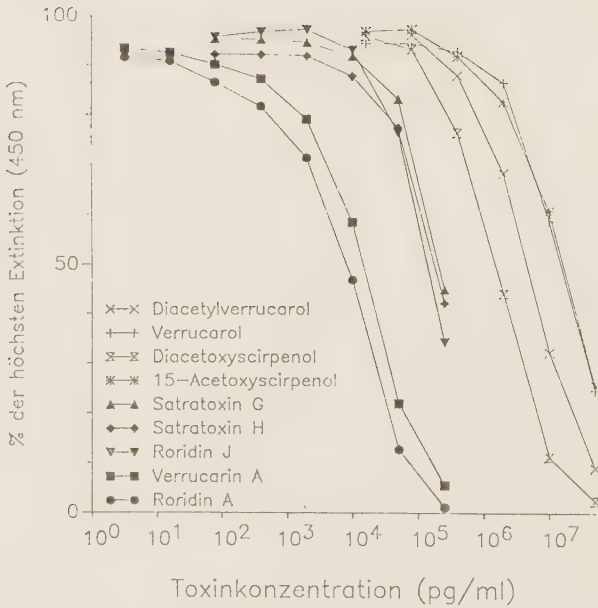


Abbildung 15: Einfluß von Roridin A und anderen Trichothecenen auf die Bindung von RA-HRP und den monoklonalen anti-Roridin A Antikörper 4H10

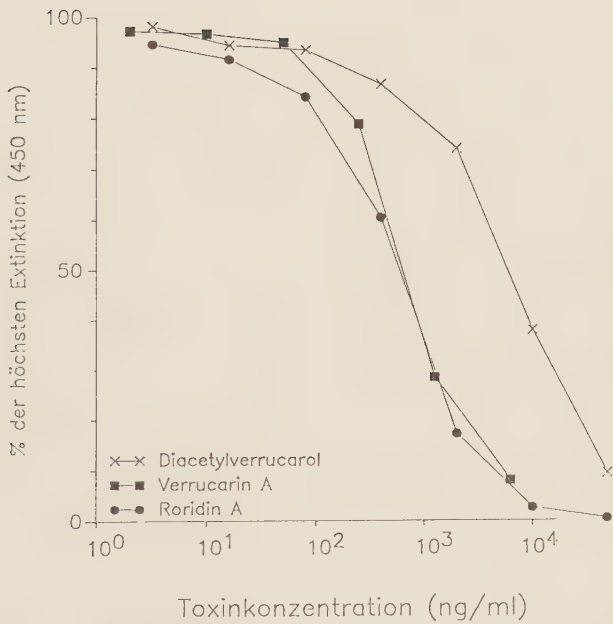


Abbildung 16: Einfluß von Roridin A und anderen Trichothecenen auf die Bindung von RA-IIRP an den monoklonalen anti-Roridin A Antikörper 3E1

Tabelle 9: Spezifität des monoklonalen anti-Roridin A
Antikörpers 5G11

Toxin	50% Hemmung ^a	Kreuzreaktivität ^b
	($\mu\text{mol/l}$)	relativ zu Roridin A (%)
Roridin A	0,007	100
Roridin J	0,016	43,6
Verrucarín A	0,042	16,7
Satratoxin G	0,190	3,7
Satratoxin H	0,037	18,7
Diacetylverrucarol	13,208	0,05
Verrucarol	7,723	0,09

^a Konzentration von Roridin A für 50% Hemmung ($\mu\text{mol/l}$)

^b (Konzentration von Roridin A für 50% Hemmung/
Konzentration betreffendes Toxin für 50% Hemmung) $\times 100$

Tabelle 10: Spezifität des monoklonalen anti-Roridin A
Antikörpers 4H10

Toxin	50% Hemmung ^a	Kreuzreaktivität ^b
	($\mu\text{mol/l}$)	relativ zu Roridin A (%)
Roridin A	0,016	100
Roridin J	0,255	6,3
Verrucarín A	0,025	64,0
Satratoxin G	0,364	4,4
Satratoxin H	0,326	4,9
Diacetylverrucarol	8,377	0,2
Verrucarol	41,330	0,04
Diacetoxyscirpenol	2,003	0,8
15-Acetoxyscirpenol	65,660	0,02

^a und ^b siehe Tab. 9

Tabelle 11: Spezifität des monoklonalen anti-Roridin A
Antikörpers 3E1

Toxin	50% Hemmung ^a	Kreuzreaktivität ^b
	($\mu\text{mol/l}$)	relativ zu Roridin A (%)
Roridin A	1,127	100
Verrucarín A	1,254	89,8
Diacetylverrucarol	22,17	5,1

^a und ^b siehe Tab. 9

Die Affinitätskonstanten der drei monoklonalen Antikörper wurden nach der Methode von FRIGUET et al. (1985) ermittelt, bei der konstante Antikörperverdünnungen mit unterschiedlichen Toxinkonzentrationen vorinkubiert wurden und nach Eintreten eines Reaktionsgleichgewichts die Konzentration des gebundenen Antikörpers in einem klassischen indirekten EIA bestimmt wird.

Zur Auswertung wurden die reziproken Werte des gebundenen Antikörpers bzw. der jeweiligen Toxinkonzentrationen in einem Koordinatensystem gegeneinander aufgetragen und für die ermittelten Punkte Regressionsgeraden berechnet (Abb. 17). Aus der Steigung der Geraden errechnete sich für Antikörper 5G11 eine Affinitätskonstante (K_D) von $K_D = 9,25 \times 10^7$ Liter/Mol und für Antikörper 4H10 eine solche von $K_D = 1,7 \times 10^7$ Liter/Mol.

Für den Antikörper 3E1 konnte keine Affinitätskonstante ermittelt werden, da der reziproke Wert des gebundenen Antikörpers stets gleich war.

Für die Produktion von Ascites nach Injektion eines Gemisches der jeweiligen Subklone der drei Hybridome wurden bei den Hybridomen 5G11 und 3E1 nach ca. 2-3 Wochen die Mäuse getötet und die Ascitesflüssigkeit auf einmal gewonnen. Bei Hybridom 4H10 wurden durch bis zu viermalige Punktion der Bauchhöhle äthernarkotisierter Mäuse mehrere Punktate in Mengen von jeweils 2-3 ml pro Maus gewonnen.

Für den 5G11-Ascites wurde ein Antikörpertiter von 1: $1,7 \times 10^7$ ermittelt, für den 3E1-Ascites einen von 1: $2,5 \times 10^4$.

Bei den einzelnen Punktaten des 4H10-Ascites ergab sich durchwegs ein konstanter Titer von 1: $7,0 \times 10^4$, so daß in Abb. 18 nur der gepoolte Ascites berücksichtigt wurde.

Ähnliche Unterschiede zwischen den Titern der drei Antikörper hatten sich bereits bei den in vitro produzierten Antikörpern gezeigt (Abb. 18) - Antikörper 5G11 einen Titer von 1: $1,05 \times 10^4$, Antikörper 3E1 von 1: $1,25 \times 10^3$ und Antikörper 4H10 von 1: $7,5 \times 10^2$ (Tab. 12).

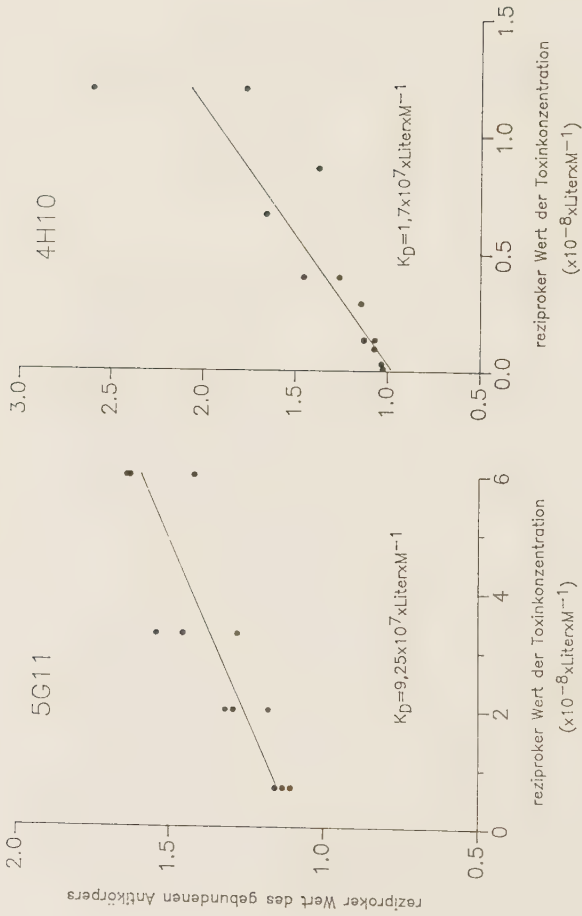


Abbildung 17: Affinitätskonstanten K_D der monoklonalen anti-Roridin A Antikörper 5G11 und 4H10

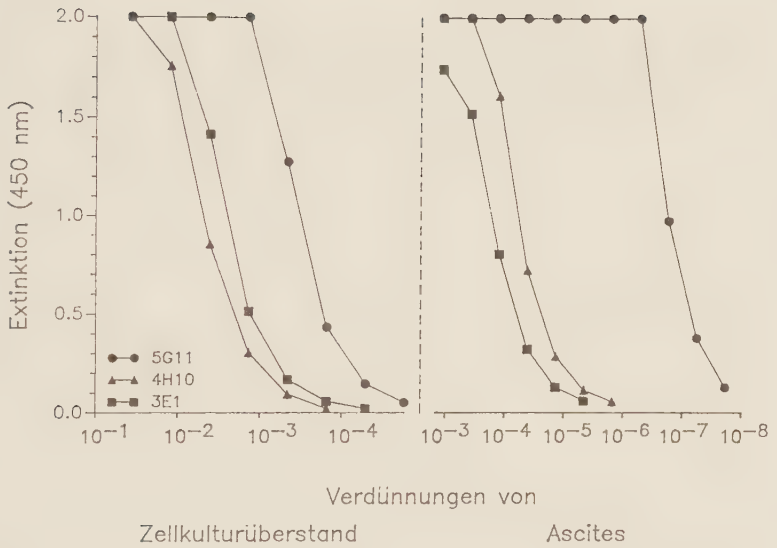


Abbildung 18: Verdünnungskurven der in vitro und in vivo produzierten drei monoklonalen anti-Roridin A Antikörper 5G11, 4H10 und 3E1

Tabelle 12: Übersicht über einige bei der Herstellung und
Charakterisierung der drei monoklonalen anti-Roridin A
Antikörper erzielten Ergebnisse

	Antikörper		
	5G11	4H10	3E1
<u>Zellkulturüberstand</u>			
Titer	$1,05 \times 10^{-4}$	$7,5 \times 10^{-2}$	$1,25 \times 10^{-3}$
<u>Ascites</u>			
Titer	$1,7 \times 10^{-7}$	$7,0 \times 10^{-4}$	$2,5 \times 10^{-4}$
Proteingehalt (mg/ml)	122,0	8,8	15,4
Nachweisgrenze (ng/ml)	0,4	1,8	110
50% Hemmung (ng/ml)	3,7	8,5	600
Affinitätskonstante (Liter/Mol)	$9,25 \times 10^7$	$1,7 \times 10^7$	---*

* war nicht zu ermitteln

Bei der abschließend zum Vergleich durchgeführten Testung der Seren von den Mäusen, deren Milzen zu den drei Hybridomen fusioniert worden waren (Maus II Hybridom 4H10, Maus III Hybridome 3E1 und 5G11), zum Nachweis von Roridin A, Verrucarlin A, Diacetylverrucarol und Verrucarol ergab sich, daß beide Seren am stärksten mit Roridin A reagierten - dagegen mit Diacetylverrucarol und Verrucarol im getesteten Bereich (50 µg/ml bis 5 pg/ml) kaum oder gar nicht. Allerdings bestanden deutliche Unterschiede zwischen den beiden Seren insofern als Serum II deutlich stärker mit Roridin A (50% Hemmung bei 0,015 µmol/l gegenüber 0,045 µmol/l) und deutlich schwächer mit Verrucarlin A (5,9% relative Kreuzreaktivität gegenüber 54,9%) reagierte als Serum III (Tab. 13).

Tabelle 13: Spezifitäten der Antiseren der Mäuse, deren Milzzellen zu den drei Hybridomen fusioniert wurden.
(Maus II: Hybridom 4H10; Maus III: Hybridome 5G11 und 3E1)

Toxin	Serum II		Serum III	
	a)	b)	a)	b)
Roridin A	0,015	(100)	0,045	(100)
Verrucarín A	0,255	(5,9)	0,082	(54,9)
Diacetyl- verrucarol	38,07	(0,004)	42,8	(0,1)
Verrucarol	>187,9	(<0,008)	>187,9	(<0,024)

a) Konzentration von Toxin für 50% Hemmung ($\mu\text{mol/l}$)

b) Kreuzreaktivität relativ zu Roridin A (%):

$$\left(\frac{\text{Konzentration von Roridin A für 50\% Hemmung}}{\text{Konzentration betreffendes Toxin für 50\% Hemmung}} \right) \times 100$$

3.3 Anwendung monoklonaler Antikörper gegen experimentelle Intoxikationen

3.3.1 Passive Immunisierung gegen T-2 Toxin bei oraler Toxinbelastung

3.3.1.1 Material

Versuchstiere

Verwendet wurden weibliche NMRI-Mäuse im Alter von sechs Wochen und einem Durchschnittsgewicht von 30 g, bezogen von Savo Ivanovas, Kisslegg/Allgäu. Die Tiere wurden in Makrolonkäfigen mit Drahtgitter aufgestellt und erhielten Futter (Altromin 1324, Haltungsdiät-Ratten und Mäuse, Altromin, Lage) und Wasser ad libitum. Nach einer Eingewöhnungszeit von einer Woche wurden sie in den Versuchen eingesetzt.

Medium

FEB 100 (Seromed, Berlin)

Reagenzien

IgG1-Standard

Von $2,0 \times 10^7$ Hybridomen des Subklones 1C4 10C/2, zur Antikörpergewinnung bis zum Absterben in 200 ml FEB 100-Medium unter den üblichen Bedingungen kultiviert, wurde der Überstand gewonnen. Dieser wurde mit einem gleichen Volumen gesättigter Ammoniumsulfatlösung zweimal im Eisbad gefällt (JONAK, 1980) und zur Entfernung der Sulfationen gegen PBS dialysiert. Das Material hatte einen Proteingehalt von 1,5 mg/ml (LOWRY et al., 1951) und erwies sich in der durchgeführten SDS-Gelelektrophorese im ultra-dünnen Polyacrylamidgel mit linearen Porengradienten ($T = 8-25\%$, $C = 3\%$) (GÖRG et al., 1982) als weitgehend rein (Abb. 19).

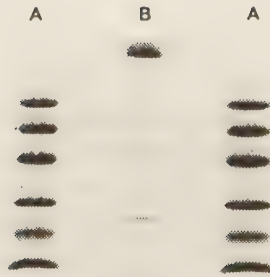


Abbildung 19: SDS-Gelelektrophorese von zweimal mit Ammoniumsulfat gefälltem serumfreiem Zellkulturüberstand des monoklonalen IgG1-Antikörpers 1C4

A: Eichproteine mit Molgewicht in Dalton von oben nach unten: Phosphorylase b, 94000; Rinderserumalbumin, 670000; Eialbumin, 43000; Carboanhydrase, 30000; Trypsininhibitor, 20000; α -Lactalbumin, 14400.

B: Monoklonaler IgG1-Antikörper 1C4

Antikörper

Zur Anwendung kam der Ascites 1C4 10C/2 mit einem IgG1-Gehalt von 25 mg/ml.

Die Bestimmung des IgG1-Gehaltes war in einem selbst entwickelten Sandwich-EIA unter Berücksichtigung der für IgG1 ermittelten Standardkurve erfolgt (Abb. 20).

Zu diesem Zweck wurden IgG1-Standardverdünnungen in einer analog zu 3.1.2.1 mit anti-Maus IgG beschichteten, abgessättigten und gewaschenen Mikrotiterplatte 1 h inkubiert. Nach Waschen wurde für 1 h Peroxidase-markiertes anti-Maus IgG1 (100 µl einer 1:1000 Verdünnung in PBS/1% FKS) (Miles Scientific, Bayer Diagnostika, München) inkubiert. Dann wurde der EIA fortgeführt und beendet analog zu 3.1.2.1. Vor allen Experimenten zur passiven Immunisierung wurde der Ascites mittels eines Spritzenfilters (0,2 µm Porengröße Nalgene, Seromed, Berlin) sterilfiltriert.

T-2 Toxin (Sigma, Deisenhofen)

Als Belastungsdosis wurde mit 17,5 mg/kg Maus eine im Rahmen früherer Versuche (HACK, 1987) ermittelte Dosis gewählt, bei der 95% eines Tierkollektivs starben (LD_{95}). Die gleichzeitig ermittelte LD_{50} für Mäuse (11,2 mg/kg Maus) stimmte annähernd überein mit der von UENO (1983) gefundenen LD_{50} von 10,5 mg/kg Maus.

Alle nicht besonders aufgeführten Chemikalien und Lösungsmittel wurden von Merck, Darmstadt, in pro analysi-Qualität bezogen.

Lösungen, Geräte und Kunststoffmaterialien entsprachen jenen in Abschnitt 3.1.1.

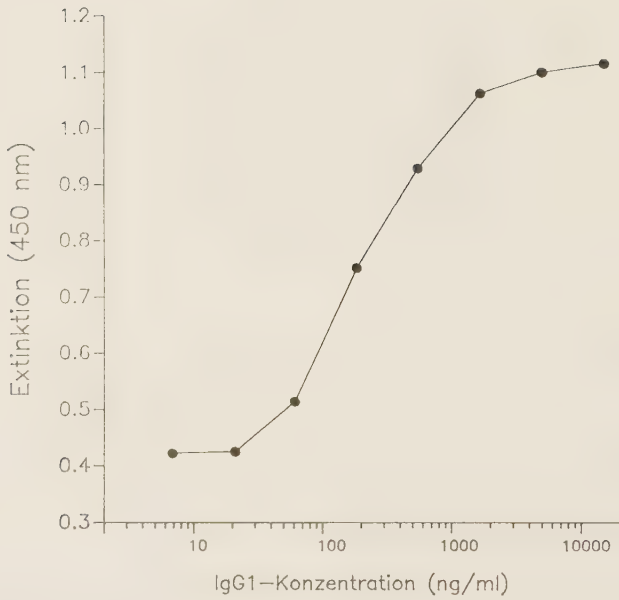


Abbildung 20: Standardkurve zur Bestimmung
des IgG1-Gehaltes im Ascites

3.3.1.2 Methodik

3.3.1.2.1 Kinetik des monoklonalen anti-T-2 Toxin Antikörpers 1C4 nach parenteraler Applikation

Zu diesem Zwecke wurde zwei Gruppen von je vier Mäusen 1C4-Antikörper mit je 560 mg/kg Maus intravenös in die Schwanzvene oder intraperitoneal appliziert. Hierfür waren pro Maus (Gewicht ca. 30 g) 672 μ l des 1C4 10C/2-Ascites erforderlich.

Den Tieren wurde nach 30 min, 2 h und dann in täglichen Abständen bis zu einer Woche nach Antikörperapplikation Blut entnommen. Von dem nach Applikationsart und Entnahmezeitpunkt getrennt gesammelten Blut wurden die Seren gewonnen und deren Titer ermittelt wie unter 3.1.2.1 beschrieben. Zum Vergleich wurde der Antikörpertiter bestimmt, den die Maus, deren Milzzellen zum Klon 1C4 fusioniert worden waren, am Tage der Fusion aufwies.

(Auch in diesen Versuchen wurde als Titer die Antikörperverdünnung bezeichnet, die im EIA einer Extinktion von 0,3 entsprach.)

3.3.1.2.2 Passive Immunisierung

3.3.1.2.2.1 Intravenöse Antikörperapplikation und orale Intoxikation

Zehn 30 g schweren Mäusen wurde 30 min nach intravenöser Antikörperapplikation (672 μ l des 1C4 10C/2-Ascites) in PBS/1% Ethanol gelöstes T-2 Toxin in der LD₉₅ oral mit einer gebogenen Knopfkanüle gegeben. Die Antikörperdosis entsprach dem 0,1fachen einer äquimolaren Menge der LD₉₅ von T-2 Toxin. (Bei einem Gewicht von 30 g, bei der die zu applizierende LD₉₅ T-2 Toxin 525 μ g oder 1,12 μ mol beträgt, beläuft sich die Antikörperdosis z.B. auf 0,112 μ mol oder 16,8 mg IgG1 pro Maus.)

Als Kontrollen dienten Tiere, die anstelle des anti-T-2 Toxin Antikörpers die gleiche Menge eines nicht kreuzreagierenden IgG1-Antikörpers (gegen Roridin A) bzw. statt T-2 Toxin PBS/1% Ethanol erhalten hatten.

Die Tiere wurden in regelmäßigen Abständen (bis zu sieben Tage nach Toxinapplikation) beobachtet und die Anzahl der Überlebenden festgehalten.

3.3.1.2.2 Intraperitoneale Antikörperapplikation und orale Intoxikation

Um den Einfluß höherer Antikörperdosierung festzustellen, wurden sieben Versuchstieren je 2 ml 1C4 10C/2-Ascites 30 min vor der LD₉₅ von T-2 Toxin intraperitoneal verabreicht. Diese Antikörpermenge entspricht etwa dem dreifachen der intravenös applizierten Dosis.

Im übrigen wurde analog zu 3.3.1.2.2.1 vorgegangen.

3.3.1.3 Ergebnisse

Bei den Untersuchungen zur Antikörperkinetik nach passiver Immunisierung zeigte sich, daß nach intravenöser Antikörperapplikation der höchste Titer (1:35000) schon nach 30 min erreicht war, bei intraperitonealer Applikation erst nach 2 h (1:17000). Zu diesem Zeitpunkt waren die Titer beider Versuchstiergruppen annähernd gleich hoch (Abb. 21). Im weiteren Verlauf war nach intravenöser Applikation ein deutlich schnellerer Titerabfall festzustellen und die Antikörper waren nur bis zu 48 h post applicationem nachweisbar, nach intraperitonealer Applikation aber noch bis zu 72 h.

Die durch passive Immunisierung erzielten Titer waren deutlich niedriger als der Titer der mit 350 µg T-2-BSA aktiv immunisierten Maus (1:96000), deren Milzzellen zum Hybridom 1C4 fusioniert worden waren (siehe 3.1.2.1 und

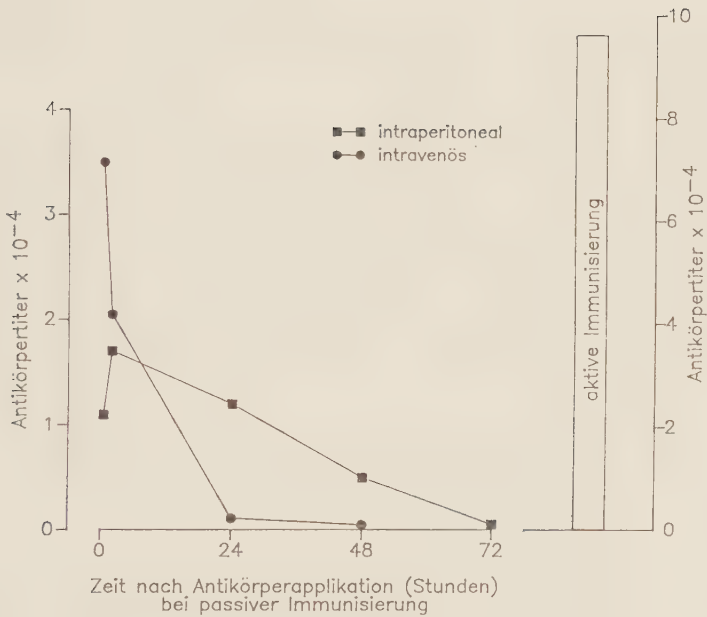


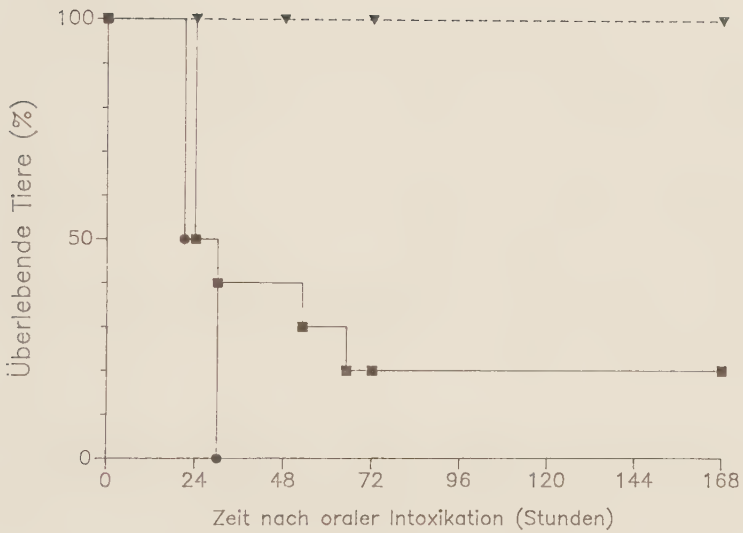
Abbildung 21: Kinetik des monoklonalen anti-T-2 Toxin Antikörpers 1C4 nach intravenöser bzw. intraperitonealer Applikation von 560 mg IgG1 pro kg Maus; rechts im Diagramm der durch aktive Immunisierung erzielte Titer

3.1.2.2) (Abb. 21).

Zur Überprüfung der Belastbarkeit der durch den monoklonalen anti-T-2 Toxin-Antikörper 1C4 erzeugten Immunität wurde zehn Mäusen die LD₉₅ von T-2 Toxin (17,5 mg/kg Maus) per os 30 min nach Antikörpergabe verabreicht. Bei einer intravenös applizierten Antikörperdosis, die dem 0,1fachen der äquimolaren Menge der LD₉₅ von T-2 Toxin entspricht (=560 mg IgG1 pro kg Maus) überlebten 20% der immunisierten Tiere den auf eine Woche begrenzten Versuch (Abb. 22). Acht der immunisierten Tiere starben zwischen 24 und 63 h nach Belastung, während die nicht-immunisierten Tiere spätestens nach 30 h verstorben waren.

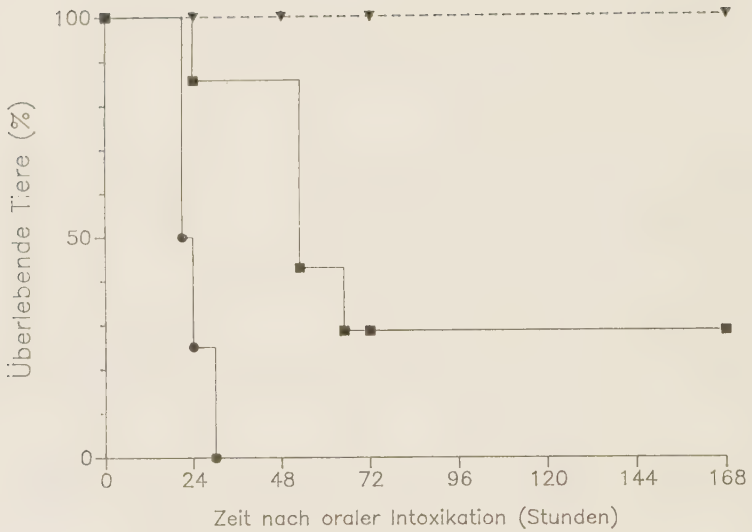
Bei der Steigerung der Antikörperdosis auf 1680 mg anti-T-2 Toxin Antikörper pro kg Maus durch intraperitoneale Applikation überlebten 28,6% den Versuch. Die restlichen fünf Tiere starben durchwegs deutlich später als die drei nicht-immunisierten Kontrollen (Abb. 23).

In beiden Experimenten überlebten alle Tiere, die die entsprechende anti-T-2 Toxin Antikörperdosis und PBS/1% Ethanol erhalten hatten.



- 560 mg Antikörper 1C4 pro kg Maus und LD₅₀ von T-2 Toxin (n=10)
- 560 mg Kontroll-IgG1 pro kg Maus und LD₅₀ von T-2 Toxin (n=4)
- ▼ 560 mg Antikörper 1C4 pro kg Maus und PBS/1% Ethanol (n=3)

Abbildung 22: Einfluß des intravenös applizierten monoklonalen anti-T-2 Toxin Antikörpers 1C4 auf die Überlebensrate 30 min danach oral mit T-2 Toxin belasteter Mäuse



- 1680 mg Antikörper 1C4 pro kg Maus und LD₅₀ von T-2 Toxin (n=7)
- 1680 mg Kontroll-IgG1 pro kg Maus und LD₅₀ von T-2 Toxin (n=4)
- ▼ 1680 mg Antikörper 1C4 pro kg Maus und PBS/1 % Ethanol (n=3)

Abbildung 23: Einfluß des intraperitoneal applizierten mono-
klonalen anti-T-2 Toxin Antikörpers 1C4 auf
die Überlebensrate 30 min danach oral mit
T-2 Toxin belasteter Mäuse

3.3.2 Passive Immunisierung gegen Roridin A bei oraler Toxinbelastung ^{*)}

3.3.2.1 Material

Reagenzien

Antikörper

Auf Grund der Bindungseigenschaften des monoklonalen anti-Roridin A Antikörpers 5G11 und des hohen Antikörpertiters ($1: 1,7 \times 10^7$) des Ascites wurde der 5G11-Ascites angewendet.

Der mittels des Sandwich-EIA (siehe 3.3.1.1) bestimmte IgG1-Gehalt des 1:30 in PBS vorverdünnten Ascites betrug 10 mg/ml.

Vor allen Experimenten zur passiven Immunisierung wurden die Antikörperlösungen mittels eines Spritzenfilters (0,2 µm Porengröße, Nalgene, Seromed, Berlin) sterilfiltriert.

Roridin A (Sigma, Deisenhofen)

Als Belastungsdosis wurde mit 17,9 mg/kg Maus die orale Dosis gewählt, bei der 90% eines Tierkollektivs starben (LD_{90}). Diese Dosis wurde im Rahmen anderer Untersuchungen im Hause ermittelt (HACK, 1987). Die gleichzeitig ermittelte LD_{50} (10,8 mg/kg Maus) stimmte weitgehend mit dem von HABERMEHL et al. (1985) gefundenen Wert von 9 mg/kg Maus überein.

*) Da die Abschnitte "Material" und "Methodik" mit jenen des vorhergehenden Abschnittes weitgehend übereinstimmen, wurden hier nur die davon abweichenden bzw. zum Verständnis unbedingt erforderlichen Angaben aufgenommen.

3.3.2.2 Methodik

3.3.2.2.1 Kinetik des monoklonalen anti-Roridin A Antikörpers 5G11 nach parenteraler Applikation

Zur Bestimmung der Antikörperkinetik wurde zwei Gruppen von je vier Mäusen 1,5 mg Antikörper 5G11 pro Maus (150 µl des o.a. Ascites mit PBS auf 500 µl verdünnt) entweder intravenös in die Schwanzvene oder intraperitoneal appliziert. Den Tieren wurde das erste Mal nach 30 min, das zweite Mal nach 2 h und dann in mehrtägigen Abständen bis zu drei Wochen nach Applikation Blut entnommen. Das Blut wurde nach Applikationsart und Entnahmezeitpunkt getrennt gesammelt. Von den daraus gewonnenen Seren wurden die Titer ermittelt wie unter 3.2.2.1 beschrieben.

Als Vergleich für die Höhe des erzielten Titers diente der Titer der aktiv immunisierten Maus, deren Milzzellen zum Hybridom 5G11 fusioniert worden waren.

(Als Titer wurde auch hier die Verdünnung bezeichnet, die im EIA einer Extinktion von 0,3 entsprach.)

3.3.2.2.2 Passive Immunisierung

3.3.2.2.2.1 Intravenöse Antikörperapplikation vor oraler Intoxikation

Zwei Gruppen zu je zehn Mäusen (Gewicht ca. 30 g) erhielten 1,5 mg Antikörper 5G11 pro Tier intravenös verabreicht. Diese Antikörperdosis entspricht dem 0,01fachen der äquimolaren Menge der LD₉₀ von Roridin A.

Den Mäusen der einen Gruppe wurde nach 45 min, jenen der anderen nach 24 h 537 µg in 500 µl PBS/1% Ethanol gelöstes Roridin A pro Tier (=LD₉₀) mittels gebogener Knopfkanüle oral verabreicht. Als Kontrolle dienten Mäuse, die anstelle des anti-Roridin A Antikörpers die gleiche Menge eines nicht kreuzreagierenden IgG1-Antikörpers bzw. statt der

Toxinlösung PBS/1% Ethanol erhalten hatten.

Die Tiere wurden bis zu 14 Tage nach der Roridin A-Gabe regelmäßig beobachtet und die Anzahl der Überlebenden festgehalten.

3.3.2.2.2 Intravenöse Antikörperapplikation nach oraler Intoxikation

Zehn Mäuse erhielten die orale LD_{90} von Roridin A und 2 h später intravenös 1,5 mg anti-Roridin A Antikörper 5G11. Im weiteren (Kontrollen, Beobachtung der Tiere) wurde der Versuch analog zu 3.3.2.2.2.1 durchgeführt.

3.3.2.3 Ergebnisse

Bei den Untersuchungen zur Kinetik des monoklonalen anti-Roridin A Antikörpers 5G11 zeigte sich, daß nach intravenöser Applikation von jeweils 1,5 mg pro Maus der höchste Antikörpertiter (1:35000) schon bei der ersten Blutentnahme (30 min) erreicht war, nach intraperitonealer Applikation aber erst nach 2 h (1:32000). Der weitere Verlauf der Kurven ist weitgehend identisch. Auch wenn innerhalb von 48 h bis 72 h ein deutlicher Titerabfall zu registrieren war, so waren bis in die dritte Woche hinein Titer von anti-Roridin A Antikörpern nachweisbar (Abb. 24). Die auf diese Weise erzielten Antikörpertiter lagen bereits 24 h nach Applikation unter jenen der mit 225 µg RA-HSA aktiv immunisierten und als Milzzellenspender verwendeten Maus (Abb. 24).

Bei den Experimenten zur Prüfung der passiven Immunisierung gegenüber zuvor bzw. danach per os appliziertem Roridin A wurde der Antikörper 5G11 wieder in einer Dosis intravenös appliziert, die dem 0,01fachen einer äquimolaren Konzentration der LD_{90} von Roridin A entspricht.

Bei einer Antikörpergabe 45 min vor oraler Intoxikation überlebten bei einer Beobachtungszeit von 2 Wochen alle

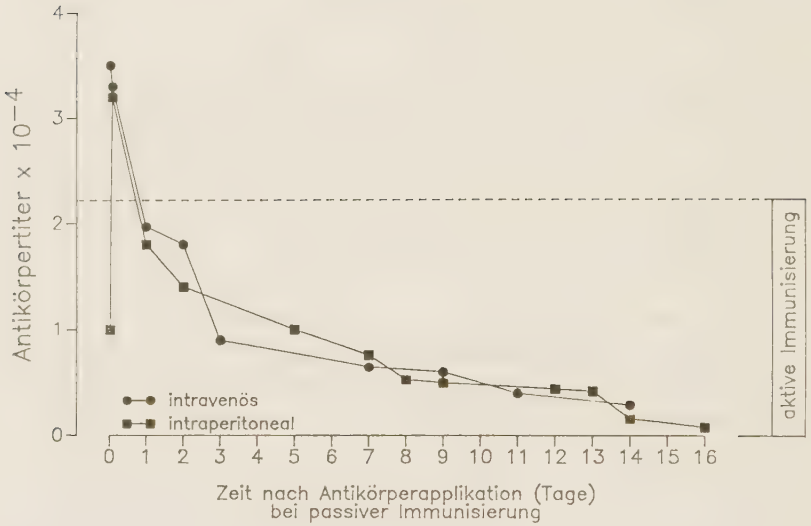
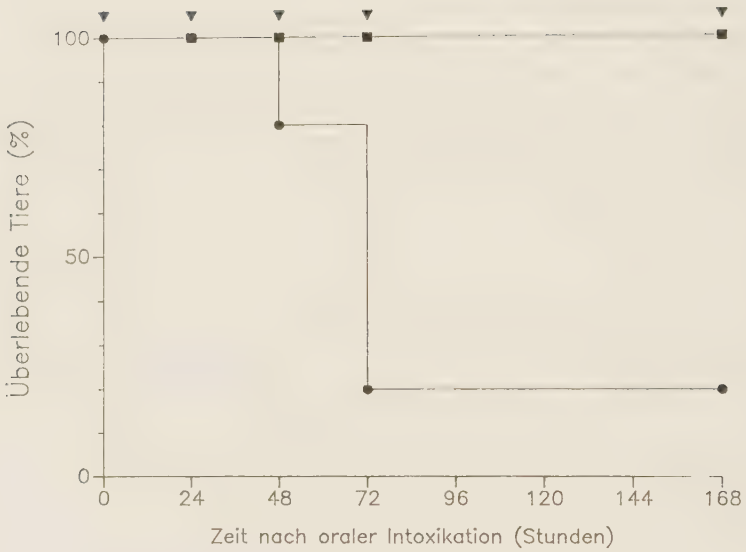


Abbildung 24: Kinetik des monoklonalen anti-Roridin A Antikörpers 5G11 nach intravenöser bzw. intraperitonealer Applikation von 50 mg IgG1 pro kg Maus; rechts im Diagramm der durch aktive Immunisierung erreichte Titer

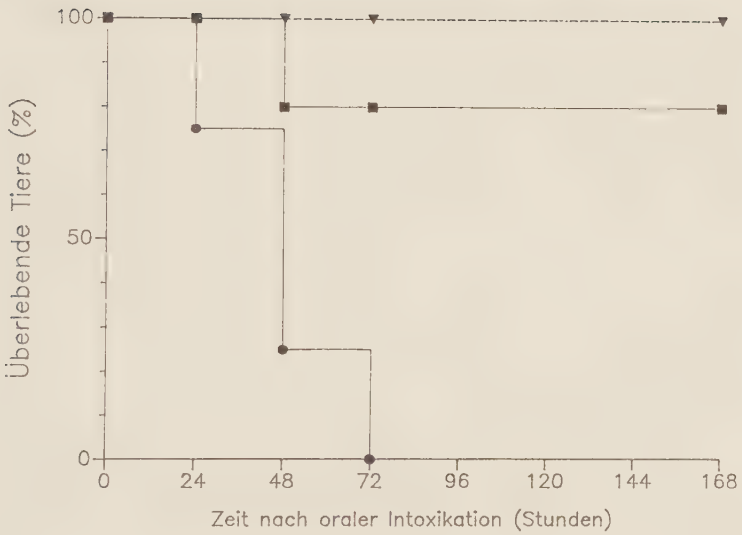
zehn Tiere die LD_{90} von Roridin A (Abb. 25). Der Schutz war damit deutlich stärker ausgeprägt als bei Antikörpergabe 24 h vor oraler Intoxikation (20% der immunisierten Tiere starben - Abb. 26 -) bzw. bei Antikörpergabe 2 h nach oraler Intoxikation (Tod von 40% der immunisierten Tiere - Abb. 27 -).

Bei allen drei Experimenten wurden bezüglich der Kontrollen die erwarteten Ergebnisse erzielt: Tiere, die nur den spezifischen Antikörper 5G11 und PBS/1% Ethanol erhalten hatten, überlebten, während die Mäuse, denen das Toxin und ein nicht mit Roridin A reagierender IgG1-Antikörper gegeben worden war, mit einer Ausnahme innerhalb von 72 h nach Aufnahme von Roridin A verstorben waren.



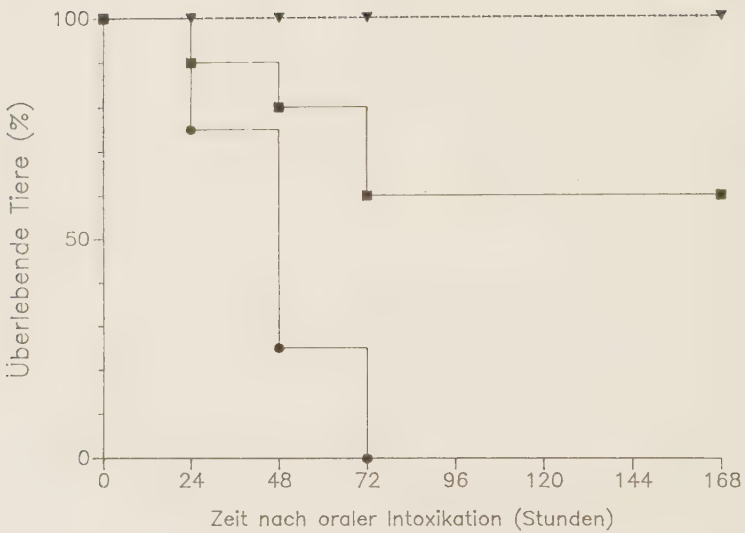
- 50 mg Antikörper 5G11 pro kg Maus und LD₉₅ von Roridin A (n=10)
- 50 mg Kontroll-IgG1 pro kg Maus und LD₉₅ von Roridin A (n=5)
- ▼ 50 mg Antikörper 5G11 pro kg Maus und PBS/1% Ethanol (n=3)

Abbildung 25: Einfluß des intravenös applizierten monoklonalen anti-Roridin A Antikörpers 5G11 auf die Überlebensrate 45 min danach oral mit Roridin A belasteter Mäuse



- 50 mg Antikörper 5G11 pro kg Maus und LD₉₅ von Roridin A (n=10)
- 50 mg Kontroll-IgG1 pro kg Maus und LD₉₅ von Roridin A (n=4)
- ▼ 50 mg Antikörper 5G11 pro kg Maus und PBS/1% Ethanol (n=3)

Abbildung 26: Einfluß des intravenös applizierten monoklonalen anti-Roridin A Antikörpers 5G11 auf die Überlebensrate 24 h danach oral mit Roridin A belasteter Mäuse



- 50 mg Antikörper 5G11 pro kg Maus und LD₅₀ von Roridin A (n=10)
- 50 mg Kontroll-IgG1 pro kg Maus und LD₅₀ von Roridin A (n=4)
- ▼ 50 mg Antikörper 5G11 pro kg Maus und PBS/1% Ethanol (n=3)

Abbildung 27: Einfluß des intravenös applizierten monoklonalen anti-Roridin A Antikörpers 5G11 auf die Überlebensrate 2 h zuvor oral mit Roridin A belasteter Mäuse

4. Besprechung der Ergebnisse und Diskussion

Die Aufnahme von Mykotoxinen mit der Nahrung durch direkt mit toxinbildenden Pilzen befallene Lebensmittel oder durch "carry-over" via Futtermittel auf Lebensmittel tierischen Ursprungs stellt ein bedeutendes Risiko für die menschliche Gesundheit dar. Die Erkennung von Mykotoxinen in Lebensmitteln und Futtermitteln landwirtschaftlicher Nutztiere ist somit ein wichtiges Ziel des Verbraucherschutzes, das am Lehrstuhl, unter Verwendung immunologischer Nachweisverfahren (BIERMANN und TERPLAN, 1980; MÄRTLBAUER und TERPLAN, 1985) seit langem verfolgt wird. Einen besonderen Schwerpunkt bilden in letzter Zeit die Trichothecene, wobei für T-2 Toxin (ESGIN, 1987), Diacetoxyscirpenol (KLAFFER et al., 1988) und Roridin A (MÄRTLBAUER et al., 1988) direkte Enzymimmunoassays (EIAs) erstellt wurden.

Polyklonale Antisera weisen aber für die immunochemische Diagnostik vor allem die Nachteile auf, daß es sich um heterogene Antikörperfraktionen handelt und sich ihre Zusammensetzung und Konzentration von Entnahmezeitpunkt zu Entnahmezeitpunkt und von Individuum zu Individuum unterscheidet. Diese Faktoren haben bisher eine Standardisierung der immunologischen Nachweisverfahren erschwert.

Da durch die Verwendung monoklonaler Antikörper diese Nachteile beseitigt würden, war es seit langem das Bestreben in der Forschungsrichtung des Lehrstuhls, monoklonale Antikörper gegen Mykotoxine herzustellen.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten solche Antikörper gegen die Trichothecene T-2 Toxin und Roridin A hergestellt und auf ihre Eignung zum Nachweis der Toxine getestet werden. Außerdem sollte untersucht werden, ob durch ihre parenterale Applikation eine Prophylaxe oder Therapie von experimentellen oralen Intoxikationen erreicht werden kann.

Die acht mit käuflichem, nach der Methode von CHU et al. (1979) hergestelltem und gegen PBS dialysiertem (HUNTER et al., 1985) T-2-BSA intraperitoneal immunisierten Mäuse wiesen am Tage der Fusion Serumtiter von mindestens 1:20000 auf. GENDLOFF et al. (1987) dagegen konnten nach einem vergleichbaren Immunisierungsschema keine anti-T-2 Toxin Antikörper nachweisen und wählten einen anderen Applikationsweg, den subkutanen.

Allerdings konnten trotz der hohen Serumtiter bei den acht durchgeführten Fusionen nur insgesamt 337 Hybridome gefunden werden, von denen eines anti-T-2 Toxin Antikörper produzierte. Die Fusionsfrequenzen (Anzahl bewachsener/Anzahl beschickter Kavitäten) lag zwischen 7,0 und 17,0%. Auch HUNTER et al. (1985) geben Fusionsfrequenzen von durchwegs unter 10%, manchmal von unter 1%, nach Verbesserung ihrer Immunisierungsbedingungen von 3,8% an. Diese Autoren führten die geringen Fusionsfrequenzen auf das aus dem Antigen freigesetzte T-2 Toxin zurück, das auch die proliferierenden B-Lymphoblasten schädigt. Es ist vorstellbar, daß der toxische Effekt des T-2 Toxins zum Zeitpunkt der Fusion besonders zum Tragen kommt, da die letzte Restimulierung ohne das Adjuvans erfolgte, welches während der vorhergehenden Immunisierungen die Resorption des freigesetzten T-2 Toxins verzögert haben dürfte. GENDLOFF et al. (1987) dagegen berichten von einer Fusionsfrequenz von 95,3%, konnten aber auch nur einen anti-T-2 Toxin Antikörper isolieren.

Der Nachweis der monoklonalen Antikörper, wie auch der Serumantikörper, erfolgte mit einem direkten EIA mit einer modifizierten Doppelantikörpertechnik (ARAKAWA et al., 1981; MEYER und GÜVEN, 1986). Während bisher für den Nachweis monoklonaler Antikörper gegen Trichothecene indirekte EIAs verwendet wurden (HUNTER et al., 1985; OTHANI et al., 1985; PAULY et al., 1986; GENDLOFF et al., 1987; GOODBRAND et al., 1987), bietet die hier vorgestellte Methode den Vorteil, daß die Herstellung verschiedener Toxin-Protein-

Konjugate für Immunisierung und Beschichtung der Mikrotiterplatten entfällt und statt dessen die für die vorhandenen direkten EIAs hergestellten Toxin-Enzymkonjugate verwendet werden konnten. Daneben erlaubt diese Technik ein flexibleres Arbeiten, da die mit anti-Maus-Antikörper beschichteten Mikrotiterplatten für jeden EIA mit enzymmarkierten Liganden und Mausantikörpern verwendet werden können und - wegen der Beschichtung im Überschuß - mehrere Wochen ohne Aktivitätsverlust im Kühlschrank gelagert werden können. Außerdem kann durch die Wahl des zur Beschichtung verwendeten anti-Antikörpers auf bestimmte Antikörperklassen oder -subklassen selektiert werden (z.B. durch Verwendung von anti-Maus IgG auf Maus IgG). Die von HOFMANN (1986) bzw. MEYER und HOFMANN (1987) beschriebene Methode der Beschichtung mit Protein A anstelle des anti-Antikörpers kann für murine Antikörper nicht angewendet werden, da sich nur IgG2a, IgG2b und IgG3 an Protein A binden. Der Mehrzahl der IgG1 Antikörper - dieser Immunglobulinsubklasse gehörten alle in der vorliegenden Arbeit beschriebenen monoklonalen Antikörper an - und der IgM Antikörper dagegen werden nicht gebunden (GODING, 1986) und könnten daher mit Protein A nicht erfaßt werden.

Die beim ersten Test auf Antikörperproduktion nach den Fusionen beobachteten zahlreichen im EIA positiven Reaktionen, die auf Grund des fehlenden Hybridomwachstums als falsch-positiv bezeichnet wurden, sind nicht auf Fehler des Nachweissystems zurückzuführen. Es dürfte sich vielmehr um Reaktionen von spezifischen Antikörpern gehandelt haben, da bei vergleichbaren Untersuchungen durch Inkubation des Zellkulturüberstandes mit dem jeweiligen Hapten eine vollkommene, zumindest weitgehende Hemmung dieser Reaktion erzielt werden konnte. Als Ursprung dieser spezifischen Antikörper kommen zwei Möglichkeiten in Frage: zum einen vor der mikroskopischen Untersuchung abgestorbene antikörperproduzierende Hybridome - eine Hypothese, die angesichts

der hohen Zahl an EIA-positiven Kavitäten eher unwahrscheinlich ist; zum anderen Milzzellen bzw. Milzzellfragmente, die innerhalb ihrer Lebensspanne von einigen Tagen in vitro so hohe Antikörperkonzentrationen produzierten (GODING, 1986), daß die Verdünnung durch Medienwechsel nicht zur Elimination der Antikörper ausreichte.

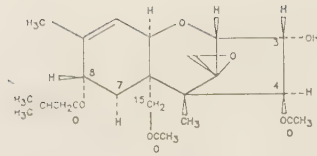
Der nach der zweiten Fusion von mit T-2-BSA stimulierten Milzzellen und X63-Ag8.653-Myelomzellen sezernierte monoklonale Antikörper 1C4 gehörte wie alle anderen monoklonalen anti-T-2 Toxin Antikörper, von denen Angaben vorliegen (HUNTER et al., 1985; GENDLOFF et al., 1987; GOODBRAND et al., 1987), zur IgG1-Subklasse (Tab. 2). Es spricht einiges dafür, daß durch die Wahl der mehr oder weniger ähnlichen Immunisierungsschemata und besonders durch das von allen Autoren verwendete Freund'sche Adjuvans, bevorzugt IgG1-Antikörper selektiert werden (SCHULZE et al., 1985; GODING, 1986).

Da nur von HUNTER et al. (1985) die Affinitätskonstanten für die Antikörper ermittelt wurden - die Versuche zur Ermittlung der Affinitätskonstanten des monoklonalen Antikörper 1C4 nach der Methode von FRIGUET et al. (1985) schlugen fehl - mußte, um die Affinitäten der Antikörper vergleichen zu können, auf die von allen Autoren angegebenen (HUNTER et al., 1985; OTHANI et al., 1985; GENDLOFF et al., 1987) bzw. aus ihren Angaben errechenbaren Werte (GOODBRAND, 1987) für die Nachweisgrenze ausgewichen werden. Die Werte für die 50% Hemmung pro ml wären zwar für einen Vergleich besser geeignet gewesen, lagen aber nicht bei allen Autoren vor. Es muß also bei den Vergleichen die Einschränkung gemacht werden, daß sich neben den Eigenschaften der monoklonalen Antikörper auch die Testbedingungen und die Definition von "Nachweisgrenze" unterscheiden.

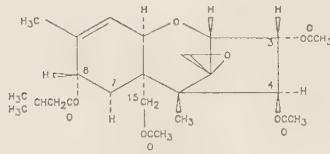
Für den monoklonalen Antikörper 1C4 wurde eine Nachweisgrenze von 2,5 ng/Ansatz ermittelt, ein Wert, der deutlich besser ist als der von HUNTER et al. (1985) angegebene von

50 ng/Ansatz für die Antikörper 12C12 und 15H6. Empfindlichere Nachweissysteme stellten GENDLOFF et al. (1987) und GOODBRAND et al. (1987) vor mit 0,5 ng/Ansatz bzw. 2 ng/Ansatz. Die von OTHANI et al. (1985) für die Antikörper 7D4 und 6E9 genannten Nachweisgrenzen von 0,025 ng/Ansatz und 25 ng/Ansatz lassen sich nicht einordnen, da die Autoren keinerlei Angaben zu den Testbedingungen machten.

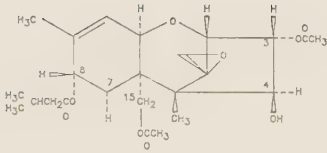
Mit dem monoklonalen Antikörper 1C4 waren zwar mit Acetyl T-2, Iso T-2, HT-2, T-2 Triol und T-2 Tetraoltetraacetat Kreuzreaktionen zu beobachten, mit T-2 Tetraol, Diacetoxy-scirpenol, 3 α -Acetyldiacetoxyscirpenol, Scirpentriol, Verrucarol, Neosolaniol, Nivalenol, Deoxynivalenol und Roridin A wurde jedoch im Bereich von 50 ng/ml bis 5 pg/ml keine 50% Hemmung festgestellt. Kreuzreaktivitäten traten somit nur bei zur Gruppe A (UENO, 1977) gehörenden, mit einer Karbonsäure (Isovaleriansäure oder Essigsäure) am C-8 Atom substituierten Trichothecen auf. Aus der Tatsache, daß bei den vier Trichothecen, die ebenso wie T-2 Toxin am C-8 einen Isovalerylrest aufweisen, Kreuzreaktivitäten relativ zu T-2 Toxin von 82,8% (Acetyl T-2) bis 13,3% (T-2 Triol), bei dem sich von Acetyl T-2 allein hinsichtlich des Substituenten am C-8 (Acetylrest) unterscheidenden T-2 Tetraoltetraacetat aber nur eine von 1,0% registriert wurde (Abb. 28), kann gefolgert werden, daß der Isovalerylrest die immunologisch dominierende Gruppe ist. Die Art der Seitenkette am C-4 Atom scheint ebenfalls einen, wenn auch geringeren Einfluß auf das Reaktionsvermögen zu haben,



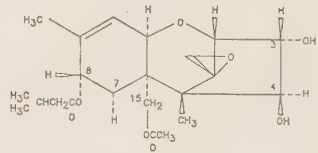
T-2 Toxin (100%)



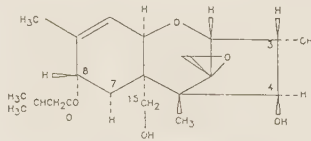
Acetyl T-2 (82,8%)



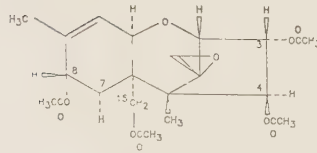
Iso T-2 (30,0%)



HT-2 (29,2%)



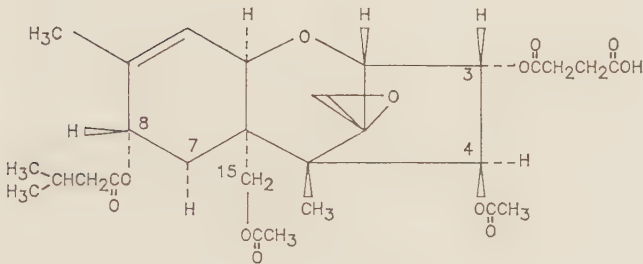
T-2 triol (13,3%)



T-2 Tetraacetate (1,0%)

Abbildung 28: Relative Kreuzreaktivität des anti-T-2 Toxin Antikörpers 1C4 mit T-2 Toxin und anderen Trichothecenen im Hinblick auf die chemische Struktur dieser Substanzen

während die Seitenketten der Positionen C-3 und C-15 für die Bindung des monoklonalen anti-T-2 Toxin Antikörpers 1C4 offensichtlich eine weniger wichtige Rolle spielen. Diese immunologische Dominanz der Position C-8 ist auf die chemische Struktur des verwendeten Antigens T-2-BSA zurückzuführen, das durch Kopplung von BSA an das an Position C-3 zu T-2-Hemisuccinat derivatisierte T-2 Toxin entstand (Abb. 29). Als Folge davon ist die am weitesten hiervon entfernte Gruppe am C-8 am besten für den Antikörper zugänglich und wird somit zur wichtigsten Stelle für die Erkennung.



T-2 Toxin-Hemisuccinat

Abbildung 29: Strukturformel von T-2 Toxin-Hemisuccinat

Beim Vergleich mit den Kreuzreaktivitäten des Serums der Maus, deren Milzzellen zum Hybridom 1C4 fusioniert wurden, fielen besonders die viel höheren Kreuzreaktivitäten von Acetyl T-2 ($>100000\%$) und Iso T-2 ($>8000\%$), aber auch die niedrigere Kreuzreaktivität von T-2 Triol (0,22%) auf. Auch PETERS et al. (1982), GENDLOFF et al. (1984) und ESGIN (1987) gaben für ihre polyklonalen, aus Kaninchen stammenden Antiseren Kreuzreaktionen von $\geq 100\%$ mit Acetyl T-2 bzw. solche von $<2\%$ mit T-2 Triol an. Verantwortlich für die hohe Kreuzreaktivität von Acetyl T-2 und Iso T-2 ist die offensichtliche Strukturanalogie dieser C-3 acetylierten Trichothecene mit T-2-Hemisuccinat (Abb. 29). Da ESGIN (1987) auch berichtete, daß sein Kaninchenserum deutlich besser mit T-2-HRP reagierte als mit HT-2-HRP, liegt der Schluß nahe, daß im polyklonalen Serum die Antikörper überwiegen, die die durch die Derivatisierung von T-2 Toxin entstandene Brücke am C-3 Atom (Abb. 29) zumindest teilweise in ihre Antigen-Bindungsstelle mit einbeziehen. Dies wie auch die Tatsache, daß alle bisher beschriebenen monoklonalen Antikörper gegen T-2 Toxin (HUNTER et al., 1985; OTHANI et al., 1985; GENDLOFF et al., 1987; GOODBRAND et al., 1987) und der eigene Antikörper 1C4 unterschiedliche Spezifitäten und Affinitäten aufweisen, ist ein weiteres Indiz dafür, daß ein polyklonales Antiserum selbst gegen ein Hapten wie T-2 Toxin aus einer Vielzahl verschiedener Antikörper besteht. Trotz der Anstrengungen der o.a. Arbeitsgruppen ist bisher die Erstellung von empfindlichen Testsystemen zum Nachweis von T-2 Toxin mit monoklonalen Antikörpern, die solche mit polyklonalen Antiseren ersetzen könnten, auf Grund der zu geringen Affinität nicht sinnvoll.

Bei der erstmals beschriebenen Herstellung monoklonaler Antikörper gegen das makrozyklische Trichothecen Roridin A traten weniger Schwierigkeiten auf. Insbesondere war die Fusionsfrequenz bei weitem höher: Bei insgesamt drei durch-

geführten Fusionen wurden im Durchschnitt in 50% der ausgesäten Zellkulturlöcher Hybridome gefunden. Das könnte daran liegen, daß, anders als bei T-2 Toxin, aus dem zur Immunisierung verwendete RA-HSA kein Toxin freigesetzt wurde, das die Immunantwort, speziell die B-Lymphozyten unmittelbar vor der Fusion, negativ beeinflusste.

Die nach den drei durchgeführten Fusionen isolierten Hybridome 4H10, 5G11 und 3E1, von denen das erste Maus II und die beiden anderen Maus III entstammten, sezernierten anti-Roridin A Antikörper, die ebenso wie der anti-T-2 Toxin Antikörper 1C4 der IgG1-Subklasse angehörten. Allerdings wiesen der Antikörper 5G11 mit 0,4 ng/ml (0,02 ng/Ansatz) und der Antikörper 4H10 mit 1,8 ng/ml (0,09 ng/Ansatz) deutlich höhere Empfindlichkeiten für Roridin A auf als der anti-T-2 Antikörper 1C4 für T-2 Toxin, während der Antikörper 3E1 mit 110 ng/ml (5,5 ng/Ansatz) noch unempfindlicher war als der anti-T-2 Antikörper 1C4.

Hinsichtlich der Spezifitäten zeigte sich, daß alle drei monoklonalen anti-Roridin A Antikörper am besten mit den getesteten Trichothecenen der Gruppe D (UENO, 1977), den makrozyklischen Trichothecenen, reagierten. Offensichtlich wurde für die drei Antikörper das Trichothecengrundgerüst zusammen mit dem makrozyklischen Ringsystem durch die Immunisierung mit RA-HSA, das durch Kopplung von Roridin A an HSA nach Derivatisierung zu Dihemisuccinat am C-2' und C-13' entstanden war, zur immunologisch dominanten Struktur (Abb. 29).

Beim Vergleich der Kreuzreaktionen kristallisierten sich drei mögliche antigene Determinanten für die Antikörper heraus (Abb. 30): Für den Antikörper 5G11 scheint die rechte Seite des Moleküls zur Erkennung besonders wichtig zu sein: Bei Roridin J, das am C-6' dieselbe Konfiguration wie Roridin A hat, belief sich die Kreuzreaktivität auf 43,6%; bei Verrucaridin A und Satratoxin H, denen diese Struktur fehlt, fiel die Kreuzreaktivität auf 16,7 bzw. 18,7% und bei Satratoxin G mit einer zusätzlichen Epoxy-

gruppe zwischen C-2' und C-3' weiter auf 3,7%. Schwache Kreuzreaktionen traten auf mit Diacetylverrucarol und Verrucarol, wobei die stärkere Reaktion mit Verrucarol überraschte.

Für den Antikörper 4H10 scheint die linke Seite des Toxinmoleküls wichtiger zu sein: Die bei Roridin A und Verrucar A identische Struktur an Position C-2' und C-3' bewirkte bei Verrucar A eine Kreuzreaktivität von 64,0%. Jede Änderung dieser Konfiguration, sei es eine Doppelbindung (Roridin J, Satratoxin H) oder eine Epoxygruppe (Satratoxin G), verursachte eine starke Verminderung der Kreuzreaktivität auf deutlich unter 10%. Ein Indiz für die Bedeutung der linken Toxinseite ist die Tatsache, daß sogar 15-Acetoxyscirpenol noch eine schwache, aber deutlich meßbare Kreuzreaktivität (0,02%) zeigte. Außerdem wurden noch bei Diacetylverrucarol, Verrucarol und Diacetoxyscirpenol geringe Kreuzreaktionen registriert. Die anderen getesteten sechs nicht-makrozyklischen Trichothecene (T-2 Toxin, T-2 Tetraol, Neosolaniol, Nivalenol, Deoxynivalenol, Fusarenon X) hatten entweder keinen Substituenten am C-15 und/oder einen Substituenten am C-7 oder C-8, der die Bindung dieser Toxine an den Antikörper 4H10 räumlich behinderte. Der Antikörper 3E1 schien für keine Seite des Toxinmoleküls eine besondere Präferenz zu besitzen. Er reagierte annähernd gleich gut mit Roridin A und Verrucar A (89,8%) und relativ stark mit Diacetylverrucarol (5,1%). Das könnte darin begründet sein, daß dieser Antikörper relativ unspezifisch die Positionen erkennt, die allen getesteten makrozyklischen Trichothecenen gemeinsam sind, und die Positionen C-2' bis C-6' mit Seitenketten in geringerem Maße in seine Antigen-Bindungsstelle einbezieht. Dieser Antikörper ist also vermutlich wenig spezifisch für Roridin A, da er eine ganze Reihe anderer makrozyklischer Trichothecene erkennen dürfte. Leider konnte diese Theorie nicht überprüft werden, da dafür auf Grund der nur geringen Affinität des Antikörpers 3E1 zu hohe Konzentrationen der mengenmäßig li-

mitierten Toxine Roridin J, Satratoxin G und H benötigt worden wären.

Beim Vergleich der monoklonalen Antikörper gegen Roridin A mit den Seren der Mäuse, deren Milzzellen zu den jeweiligen Hybridomen fusioniert wurden, fielen hinsichtlich der Kreuzreaktivität mit dem als makrozyklisches Trichothecen bei allen Untersuchungen einbezogenen Verrucarin A deutliche Unterschiede auf (Abb. 31): Der monoklonale Antikörper 4H10 wies eine stärkere Kreuzreaktivität auf als "sein" Mausserum. Entsprechendes galt auch für den Antikörper 3E1, während der aus der Milz der gleichen Maus stammende monoklonale Antikörper 5G11 eine deutlich geringere Kreuzreaktivität zeigte als "sein" Mausserum.

Im Versuchstier Maus werden durch das verwendete Antigen RA-HSA offenbar viele verschiedene Antikörper induziert. Es scheint aber in den Relationen der produzierten Antikörper zueinander starke individuelle Unterschiede zu geben. Nur so sind die Unterschiede der beiden polyklonalen Mausseren zu erklären.

Unter der Voraussetzung, daß die Reaktivität der Antiseren durch bestimmte antikörperproduzierende B-Zell-Clonotypen bestimmt wird und andere nur unwesentlichen Einfluß auf die Reaktivität haben, ist festzustellen, daß es durch die beiden Fusionen offensichtlich nicht gelungen ist, eine zum vorherrschenden Clonotyp gehörende B-Zelle zu fusionieren. Vielmehr wurden Antikörper isoliert, die mengenmäßig im Serum so gering vertreten waren, daß sie ohne die Hybridomtechnik wohl kaum hätten nachgewiesen werden können. Im Kaninchen von MÄRTLBAUER et al. (1988) schien allerdings ein Clonotyp vorzuherrschen, der eine Reaktivität des polyklonalen Serums verursachte, die fast identisch war mit der des murinen monoklonalen Antikörpers 5G11. Dafür spricht die annähernd gleiche Kreuzreaktivität nicht nur mit Verrucarin A (Abb. 31), sondern auch mit anderen makrozyklischen Trichothecenen (Tab. 14).

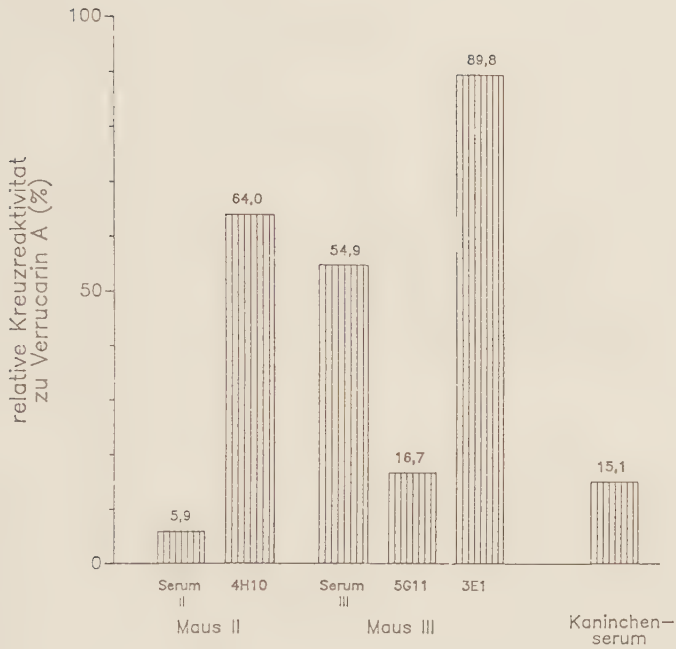


Abbildung 31: Relative Kreuzreaktivität der beiden polyklonalen Mausseren II und III, der drei monoklonalen Antikörper 4H10, 5G11 bzw. 3E1 und des polyklonalen Kaninchen-serums (MÄRTLBAUER et al., 1988) mit Verrucaric acid A

Tabelle 14: Gegenüberstellung der Spezifitäten
des murinen monoklonalen Antikörpers 5G11
und des polyklonalen Kaninchenserums von
MÄRTLBAUER et al. (1988)

Toxin	monoklonaler Antikörper 5G11		Kaninchenantiserum	
	a)	b)	a)	b)
Roridin A	0,007	(100,0)	0,030	(100,0)
Roridin J	0,016	(43,6)	0,074	(40,7)
Verrucarín A	0,042	(16,7)	0,199	(15,1)
Satratoxin G	0,190	(3,7)	0,459	(6,5)
Satratoxin H	0,037	(18,7)	0,208	(14,8)
Diacetyl- verrucarol	13,208	(0,05)	19,046	(0,15)
Verrucarol	7,723	(0,09)	60,150	(0,05)

a) und b) siehe Tab. 13

Hinsichtlich der Affinitäten der monoklonalen Antikörper und der Seren ihrer "Spendermäuse" fiel auf, daß Antikörper 5G11 mit $0,007 \mu\text{mol/l}$ eine deutlich geringere 50% Hemmungskonzentration aufwies als das Serum III mit $0,045 \mu\text{mol/l}$. In diesem Fall ist es also gelungen, eine B-Zelle zu fusionieren, die einen höher affinen Antikörper produzierte als der die Reaktivität des Serums bestimmende Clonotyp, während bei Antikörper 3E1 aus der gleichen Maus III der umgekehrte Fall ($1,127 \mu\text{mol/l}$ gegenüber $0,045 \mu\text{mol/l}$) eingetreten war. Bei Maus II gelang es eine B-Zelle zu fusionieren, die hinsichtlich der Affinität in etwa dem das Serum dominierenden Clonotyp angehörte ($0,016 \mu\text{mol/l}$ gegenüber $0,015 \mu\text{mol/l}$).

Die Affinitätskonstante für Antikörper 5G11 lautete $K_D = 9,25 \times 10^7 \text{ Liter/Mol}$ und für 4H10 $K_D = 1,7 \times 10^7 \text{ Liter/Mol}$. Die Affinitätskonstante für Antikörper 3E1 konnte mit der angewandten Methode (FRIGUET et al., 1985) nicht bestimmt werden, vermutlich wegen dessen zu geringen Affinität. Die K_D -Werte für die beiden anti-Roridin A Antikörper 5G11 und 4H10 lagen im Bereich jener anderer monoklonaler anti-Mykotoxin Antikörper (Tab. 15), aber noch bei weitem unter den Affinitäten monoklonaler Antikörper gegen andere Haptene. So beschrieben z.B. FANTL et al. (1982) anti-Progesteron Antikörper mit $K_D = 3 \times 10^{10} \text{ Liter/Mol}$ und MUDGETT-HUNTER et al. (1985) anti-Digoxin Antikörper mit $K_D = 1,7 \times 10^{12} \text{ Liter/Mol}$.

Das polyklonale anti-Roridin A Antiserum von MÄRTLBAUER et al. (1988) lag in seiner Affinität zumindest nicht besser als die beiden monoklonalen Antikörper 5G11 und 4H10, wenn auch für das Serum keine Affinitätskonstante bestimmt wurde. Die Werte für die 50% Hemmung, ermittelt in einem vergleichbaren EIA, sind bei den beiden monoklonalen Antikörpern 5G11 ($0,007 \mu\text{mol/l}$) bzw. 4H10 ($0,016 \mu\text{mol/l}$) nämlich

Tabelle 15: Affinitätskonstanten von monoklonalen
anti-Mykotoxin Antikörpern

Autor	Mykotoxin	Affinitätskonstante (Liter/Mol)
GROOPMAN et al. (1984)	Aflatoxin M ₁ , B ₁ , B ₂	1,0x10 ⁹
HUNTER et al. (1985)	T-2 Toxin	3,5x10 ⁶
"	"	5,8x10 ⁷
CANDLISH et al. (1986)	Ochratoxin A	6,2x10 ⁷
CANDLISH et al. (1987)	Aflatoxin B ₁	5,0x10 ⁸
eigene Unters. (1988)	Roridin A	9,25x10 ⁷
"	"	1,7x10 ⁷

deutlich niedriger als beim Serum ($0,03 \mu\text{mol/l}$).

Bei Roridin A ist es also gelungen, durch die Produktion von monoklonalen Antikörpern die Voraussetzungen für den Nachweis dieses Trichothecens zu verbessern. Dies gilt insbesondere für den Einsatz bei vereinfachten und schnelleren Methoden, z.B. Papierstreifentests.

Für die Experimente zur passiven Immunisierung wurden der anti-T-2 Toxin Antikörper 1C4 und der anti-Roridin A Antikörper 5G11 verwendet. Der letztere wurde gewählt, weil er von den drei monoklonalen anti-Roridin A Antikörpern die höchste Affinität zu Roridin A aufwies.

Bei den Voruntersuchungen zur Antikörperkinetik nach einmaliger intravenöser bzw. intraperitonealer Applikation von $16,8 \text{ mg}$ 1C4 bzw. $1,5 \text{ mg}$ 5G11-Antikörper pro Maus wurde festgestellt, daß der anti-T-2 Toxin Antikörper viel schneller aus dem Serum der Versuchstiere verschwunden war als der anti-Roridin A Antikörper. Trotz gleicher Immunglobulinklasse (IgG1) der beiden monoklonalen Antikörper und annähernd gleichen Ausgangstitern nach intravenöser Applikation (1:35000) waren Antikörper gegen T-2 Toxin nur 48 h nachzuweisen, während Antikörper gegen Roridin A bis zu 14 Tage gefunden wurden. Die geringere Verweilzeit des Antikörpers 1C4 im Serum kann bedingt sein durch eine schnellere Abbaurate, eine erhöhte Ausscheidung, eine spezifische oder unspezifische Anlagerung an zelluläre Bestandteile bzw. eine Kombination dieser Faktoren.

Zur Ermittlung der Belastbarkeit einer passiven Immunisierung wurde die orale Intoxikation gewählt, weil verschimmelte Nahrungs- und Futtermittel die häufigste Ursache von Mykotoxikosen sind. Die oralen Belastungsdosen sowohl für T-2 Toxin ($\text{LD}_{95} = 17,5 \text{ mg/kg KGW}$) als auch für Roridin A ($\text{LD}_{90} = 17,9 \text{ mg/kg KGW}$) wurden im Rahmen anderer Untersuchungen im Hause ermittelt (HACK, 1987).

Auf Grund der in den vorangegangenen Experimenten ermittelten geringen Affinität des anti-T-2 Antikörpers 1C4 wurde als Antikörperdosis das 0,1fache einer äquimolaren Konzentration der LD₉₅ von T-2 Toxin festgesetzt. Bei intravenöser Applikation dieser Antikörperdosis (= 560 mg/kg Maus) und 30 min später erfolgter oraler Belastung wurde nur ein mäßiger Schutzeffekt (Überlebensrate: 20%) erzielt; bei einer Erhöhung der Antikörperdosis auf 1680 mg/kg Maus, intraperitoneal appliziert, stieg die Quote der überlebenden Tiere nur unwesentlich auf 28,6% (Abb. 32). Auf Versuche mit variierenden Zeitabständen zwischen Antikörper- und Toxinapplikation wurde verzichtet, da wegen des in den Voruntersuchungen registrierten rapiden Antikörpertiterabfalls die Ergebnisse kaum besser ausgefallen wären als bei annähernd simultaner Gabe von Antikörper und Toxin. Auch erschien eine weitere Erhöhung der applizierten Antikörpermenge als wenig sinnvoll, da schon eine 300%ige Steigerung auf 1680 mg Antikörper pro kg Maus nur wenig erbracht hatte. Außerdem wäre eine Störung des Allgemeinbefindens der Tiere in Betracht zu ziehen, wenn auch die Kontrolltiere die hohe Belastung von ca. 2600 mg pro kg Maus Fremdprotein noch ohne Beeinträchtigung vertragen hatten.

Verantwortlich für die zwar vorhandene, aber relativ geringe Belastbarkeit der passiv immunisierten Tiere mit dem monoklonalen anti-T-2 Toxin Antikörper 1C4 sind wahrscheinlich zwei Faktoren, die eng miteinander verbunden sind:

1. Der sehr schnelle Abbau von T-2 Toxin durch den Organismus, insbesondere nach oraler Aufnahme zu kaum weniger giftigen Metaboliten, wie HT-2 (Abb. 4).
2. Die relativ geringe Affinität des Antikörpers 1C4 zu T-2 Toxin und die noch geringere Affinität zu HT-2 und anderen Metaboliten.

Vermutlich wirkt sich auch der schnelle Seramtiterabfall des anti-T-2 Toxin Antikörpers 1C4 negativ auf die Schutzwirkung aus.

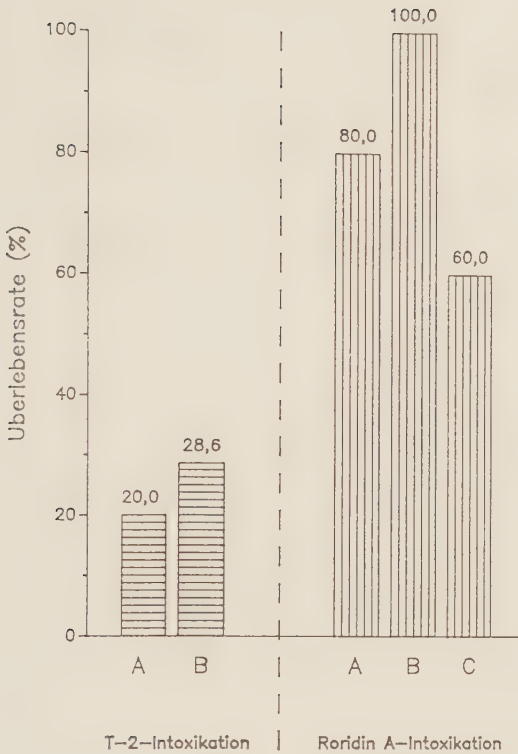


Abbildung 32: Gegenüberstellung der Ergebnisse zur Belastbarkeit der passiven Immunisierung

T-2-Intoxikation

- A: 560 mg Antikörper 1C4 pro kg Maus
30 min vor oraler Intoxikation mit LD₉₅
- B: 1680 mg Antikörper 1C4 pro kg Maus
30 min vor oraler Intoxikation mit LD₉₅

Roridin A-Intoxikation

- A: 50 mg Antikörper 5G11 pro kg Maus
24 h vor oraler Intoxikation mit LD₉₀
- B: 50 mg Antikörper 5G11 pro kg Maus
45 min vor oraler Intoxikation mit LD₉₀
- C: 50 mg Antikörper 5G11 pro kg Maus
2 h nach oraler Intoxikation mit LD₉₀

Die von FEUERSTEIN et al. (1985) bei Ratten erzielte deutlich bessere Schutzwirkung nach intravasaler Intoxikation dürfte darauf zurückzuführen sein, daß die orale LD_{95} für Mäuse mit 17,5 mg/kg deutlich höher liegt als die intravenöse LD_{100} für Ratten mit 1 mg/kg und es daher viel leichter war, T-2 Toxin und Antikörper in diesen Versuchen in äquimolaren Konzentrationen zu geben. Außerdem wurde der Antikörper 15H6 von HUNTER et al. (1985) verwendet, der nach SWANSON et al. (1987) zu 225% mit HT-2 reagiert. Es wurde also mit einem monoklonalen Antikörper immunisiert, der den Hauptmetaboliten von T-2 Toxin besser bindet als die Ausgangssubstanz.

Die von BÖHM (1987) berichtete hohe Überlebensrate (75%) oral belasteter Meerschweinchen bei gleichzeitiger intraperitonealer Gabe von 1 ml polyklonalen Kaninchen anti-T-2 Toxin Antiserum läßt sich in diesem Zusammenhang kaum vergleichen, da keine Aussagen gemacht wurden über die Qualität des eingesetzten polyklonalen Antiserums hinsichtlich Affinität, Spezifität und Antikörperkonzentration und als Belastungsdosis willkürlich das 1,5fache einer der Literatur entnommenen LD_{50} festgelegt wurde.

Bei Roridin A wurde für die Experimente zur Belastbarkeit einer passiven Immunisierung als Antikörperdosis nur das 0,01fache einer äquimolaren Menge der LD_{90} von Roridin A festgesetzt, da der monoklonale Antikörper 5G11 deutlich bessere Bindungseigenschaften aufwies als der anti-T-2-Toxin Antikörper 1C4.

Bei allen drei Versuchsansätzen war eine eindeutig bessere Schutzwirkung gegen die orale Intoxikation als bei den Versuchen mit T-2 Toxin festzustellen (Abb.32). Die verabreichten Mengen von 50 mg 5G11-Antikörper pro kg Maus erbrachten selbst bei Applikation 24 h vor bzw. 2 h nach Toxingabe noch deutlich höhere Überlebensraten (80% bzw. 60%) als die etwa 10fach bzw. 30fach höhere Antikörperdosis bei

den Versuchen mit T-2 Toxin. Bei annähernd gleichzeitiger Gabe von Antikörper und Toxin überlebten sogar alle Mäuse. Die passive Immunisierung ist in diesem Fall als Maßnahme zur Propylaxe bzw. Therapie durchaus vorstellbar. Wahrscheinlich sind für die deutlich besseren Ergebnisse bei Roridin A verantwortlich:

1. die höhere Affinität des monoklonalen Antikörpers 5G11;
2. die sehr langsame oder sehr geringe Metabolisierung von Roridin A im Organismus (GAREIS, 1988);
3. die lange Verweildauer des Antikörpers im Serum.

Die grundsätzlich schlechteren Ergebnisse bei den eigenen Experimenten zur passiven Immunisierung mit anti-T-2 Toxin Antikörpern ließen sich verbessern durch den Einsatz monoklonaler Antikörper mit deutlich höherer Affinität zu T-2 Toxin und vor allem zu HT-2 wie z.B. von FEUERSTEIN et al. (1985) beschrieben.

Grundsätzlich wäre allerdings wünschenswert, durch die Herstellung spezieller Antigene die Bildung solcher Antikörper zu induzieren, die mit möglichst vielen Trichothecen kreuzreagieren. Einen solchen sogenannten "generic antibody" haben WEI und CHU (1987) für Typ A-Trichothecene beschrieben. Im Gegensatz zu den spezifischen monoklonalen anti-Roridin A Antikörpern 5G11 und 4H10 bietet sich der monoklonale Antikörper 3E1 nach den vorliegenden Ergebnissen als "generic antibody" für die Typ D-Trichothecene (makrozyklische Trichothecene) an. Es sollte auf jeden Fall versucht werden, einen deutlich höher affinen Antikörper dieses Types zu isolieren, um diese Annahme überprüfen zu können.

5. Zusammenfassung

I.

Nach intraperitonealer Immunisierung von acht BALB/c-Mäusen mit 350 µg T-2 Toxin-Bovines Serum Albumin-Konjugat pro Tier und Fusion der stimulierten Milzzellen mit Myelomzellen (X63-Ag8.653) gelang es ein Hybridom zu isolieren, das einen monoklonalen IgG1-Antikörper gegen T-2 Toxin sezernierte. Bei Einsatz dieses monoklonalen Antikörpers 1C4 im direkten kompetitiven Enzymimmunoassay (EIA) mit Doppelantikörpertechnik ergab sich eine Nachweisgrenze von 50 ng T-2 Toxin/ml (2,5 ng T-2 Toxin/Ansatz). Der Antikörper wies Kreuzreaktivitäten auf mit Acetyl T-2 (82,8%), Iso T-2 (30,0%), HT-2 (29,2%), T-2 Triol (13,3%) und T-2 Tetraol-tetraacetat (1,0%). Der monoklonale Antikörper zeigte deutliche Unterschiede hinsichtlich Affinität und Spezifität gegenüber dem polyklonalen Serum der Maus, deren Milzzellen zum Hybridom 1C4 fusioniert wurden. Diese Beobachtungen deuten auf unterschiedliche Antigen-Bindungsstellen hin.

Nach intraperitonealer Immunisierung von drei BALB/c-Mäusen mit 225 µg Roridin A-Humanserumalbumin-Konjugat pro Tier und Fusion der stimulierten Milzzellen mit Myelomzellen (X63-Ag 8.653) konnten drei Hybridome isoliert werden, die monoklonale Antikörper gegen Roridin A sezernierten. Die Antikörper 4H10, 5G11 und 3E1, von denen die letzteren einer Maus entstammten, gehörten zwar alle zur IgG1-Subklasse, wiesen aber deutliche Unterschiede in Affinität und Spezifität auf. Als Nachweisgrenzen für Roridin A wurden im direkten kompetitiven EIA mit Doppelantikörpertechnik ermittelt: 0,4 ng/ml (0,02 ng/Ansatz) für den Antikörper 5G11, 1,8 ng/ml (0,09 ng/Ansatz) für den Antikörper 4H10 bzw. 110 ng/ml (5,5 ng/Ansatz) für den Antikörper 3E1. Mit den makrozyklischen Trichothecen Roridin J, Verrucaridin A, Satratoxin G und H bestanden folgende Kreuzreaktionen: 43,6%, 16,7%, 3,7% bzw. 18,7% bei Antikörper 5G11; 6,3%,

64,0%, 4,4% bzw. 4,9% bei Antikörper 4H10. Antikörper 3E1 zeigte eine Kreuzreaktivität von 89,8% mit Verrucarín A - die anderen makrozyklischen Trichothecene konnten nicht einbezogen werden - und 5,1% mit Diacetylverrucarol. Die Affinitätskonstante betrug für Antikörper 5G11 $K_D = 9,25 \times 10^7$ Liter/Mol und für Antikörper 4H10 $K_D = 1,7 \times 10^7$ Liter/Mol; für Antikörper 3E1 konnte sie nicht ermittelt werden.

Ursachen für die unterschiedlichen Kreuzreaktivitäten der drei monoklonalen Antikörper dürften wohl drei abweichende Antigen-Bindungsstellen sein, die sich außerdem noch beträchtlich von denen der Seren der Mäuse unterschieden, deren Milzzellen zu den drei Hybridomen fusioniert wurden.

II.

Nach intravenöser bzw. intraperitonealer Applikation von 560 mg des monoklonalen anti-T-2 Toxin Antikörpers 1C4 pro kg Maus waren 48 h bzw. 72 h lang Antikörpertiter im Serum der Mäuse nachweisbar. Nach intravenöser Applikation derselben Antikörperdosis und 30 min später vorgenommener oraler Belastung mit 17,5 mg T-2 Toxin pro kg Maus (LD_{95}) überlebten 20% der Tiere, nach intraperitonealer Applikation der dreifachen Antikörperdosis 28,6%.

Nach intravenöser bzw. intraperitonealer Applikation von 50 mg des monoklonalen anti-Roridin A Antikörpers 5G11 pro kg Maus waren noch 14 bzw. 16 Tage lang Antikörpertiter im Serum der Mäuse nachweisbar. Bei intravenöser Applikation derselben Antikörperdosis und 24 h bzw. 45 min danach durchgeführter oraler Belastung mit 17,9 mg Roridin A pro kg Maus (LD_{90}) überlebten 80% bzw. 100% der Tiere. 60% der Mäuse überlebten, wenn der Antikörper 2 h nach dem Roridin A gegeben wurde.

Summary

Production and characterization of monoclonal antibodies to the trichothecenes T-2 toxin and roridin A and their application in experimental oral intoxications

I.

After intraperitoneal immunization of eight BALB/c mice with 350 µg T-2 toxin bovine serum albumin conjugate per mouse and fusion of the stimulated splenocytes with myeloma cells (X63-Ag8.653) one hybridoma secreting a monoclonal IgG1 antibody to T-2 toxin could be isolated. Using this monoclonal antibody 1C4 in the direct competitive enzyme immunoassay (EIA) with a double antibody technique a detection limit of 50 ng T-2 toxin per ml (2.5 ng T-2 toxin per assay) was determined. The antibody had cross-reactivities with acetyl T-2 (82.8%), iso T-2 (30.0%), HT-2 (29.2%), T-2 triol (13.3%) and T-2 tetraol tetraacetate (1.0%). The monoclonal antibody showed distinct differences concerning affinity and specificity to the polyclonal serum of that mouse which splenocytes were fused to get the hybridoma 1C4. These observations point to different antigen binding-sites.

After intraperitoneal immunization of three BALB/c mice with 225 µg roridin A human serum albumin conjugate per mouse and fusion of the stimulated splenocytes with myeloma cells (X63-Ag8.653) three hybridomas secreting monoclonal antibodies to roridin A could be isolated. The antibodies 4H10, 5G11 and 3E1 - the latter derived from one mouse - belonged to the same IgG1-subclass, however showed distinct differences in affinity and specificity. The detection limits for roridin A were determined in the direct competitive EIA with a double antibody technique: 0.4 ng/ml (0.02 ng per assay) for antibody 5G11, 1.8 ng/ml (0.09 ng per assay) for antibody 4H10 and 110 ng/ml (5.5 ng per assay)

for antibody 3E1, respectively. With the macrocyclic trichothecenes roridin J, verrucarín A, satratoxin G and H the following cross-reactions were determined: 43.6%, 16.7%, 3.7% and 18.7% for antibody 5G11 and 6.3%, 64.0%, 4.4% and 4.9% for antibody 4H10, respectively. Antibody 3E1 showed a cross-reactivity of 89.9% with verrucarín A - the other macrocyclic trichothecenes could not be included - and 5.1% with diacetylverrucarol. The affinity constants were for antibody 5G11 $K_D = 9.25 \times 10^7$ liters/mol; for antibody 4H10 $K_D = 1.7 \times 10^7$ liters/mol; for antibody 3E1 K_D could not be determined. The reasons for the different cross-reactivities of the three monoclonal antibodies might be three differing antigen binding-sites which were also quite different from those of the sera of that mice which splenocytes were fused to get the three hybridomas.

II.

After intravenous and intraperitoneal application of 560 mg of the monoclonal anti-T-2 antibody 1C4 per kg mouse antibody titers were detectable in the sera of these mice for 48 h and 72 h, respectively. After intravenous application of the same amount of antibody and oral intoxication with 17.5 mg T-2 toxin per kg mouse (LD_{95}) 30 min later, 20% of the animals survived, after intraperitoneal application of the threefold amount of antibody even 28.6%.

After intravenous and intraperitoneal application of 50 mg of the monoclonal anti-roridin A antibody 5G11 per kg mouse antibody titers were detectable in the sera of these mice for 14 and 16 days, respectively. Giving the same amount of antibody intravenously followed by oral intoxication with 17.9 mg roridin A per kg mouse (LD_{90}) 24 h and 45 min later 80% and 100% of the animals survived, respectively. 60% of the animals survived giving the antibody 2 h after roridin A.

6. Literaturverzeichnis

- ARAKAWA, H., M. MAEDA, A. TSUJI und A. KAMBEGAWA (1981):
Chemiluminescence enzyme immunoassay of dehydroepiandrosterone and its sulfate using peroxidase as label.
Steroids 38, 453-464
- BAMBURG, J. R. (1983):
Biological and biochemical actions of trichothecene mycotoxins.
Prog. Mol. Subcell. Biol. 8, 41-110
- BAMBURG, J. R. und F. M. STRONG (1971):
12,13-Epoxytrichothecenes.
In: KADIS, S. A. CIEGLER und S. J. AJL:
Microbial toxins; vol. 7, p. 207-292
Academic Press, New York
- BAMBURG, J. R., N. V. RIGGS und F. M. STRONG (1968):
The structures of toxins from two strains of *Fusarium tricinctum*.
Tetrahedron 24, 3329-3336
- BEASLEY, V. R., S. P. SWANSON, R. A. CORLEY, W. B. BUCK, G. D. KORITZ und H. R. BURMEISTER (1986):
Pharmacokinetics of the trichothecene mycotoxin, T-2 toxin, in swine and cattle.
Toxicon 24, 13-23

- BIEGER, A. R. und K. P. DOSE (1985):
Resistance to metabolic conversion of the epoxide group in
trichothecenes.
in: LACEY, J.:
Trichothecenes and other mycotoxins; p. 331-336
John Wiley, Chichester
- BIERMANN, A. und G. TERPLAN (1980):
Nachweis von Aflatoxin B₁ mittels ELISA.
Arch. Lebensmittelhyg. 31, 51-57
- BÖHM, M. (1987):
Untersuchungen zur Möglichkeit einer Immunisierung gegen
Mykotoxine am Beispiel von T2-Toxin und Diacetoxyscirpenol.
Diss. med. vet. München
- BORREBAECK, C. A. K. (1986):
In vitro immunization for production of murine and human
monoclonal antibodies: present status.
Trends Biotechnol. 4, 147-153
- BUSAM, L. und G. G. HABERMEHL (1982):
Accumulation of mycotoxins by *Baccharis coridifolia*: a
reason for livestock poisoning.
Naturwissenschaften 69, 392-393
- CANDLISH, A. A. G., W. H. STIMSON und J. E. SMITH (1986):
A monoclonal antibody to ochratoxin A.
Lett. Appl. Microbiol. 3, 9-11
- DIESELBEN (1987):
The detection of aflatoxin B₁ in peanut kernels, peanut
butter and maize using a monoclonal antibody based enzyme
immunoassay.
Food Microbiol. 4, 147-153

CARRASCO, L., M. BARBACID und D. VAZQUEZ (1973):
The trichodermin group of antibiotics, inhibitors of
peptide bond formation by eukaryotic ribosomes.
Biochim. Biophys. Acta 312, 368-376

CHATTERJEE, K., R. J. PAWLOSKY, L. TREEFUL
und C. J. MIROCHA (1986):
Kinetic study of T-2 toxin metabolites in a cow.
J. Food Safety 8, 25-34

CHU, F. S., S. GROSSMAN, R.-D. WEI und C. J. MIROCHA
(1979):
Production of antibody against T-2 toxin.
Appl. Environ. Microbiol. 37, 104-108

CIOCCA, D. R., D. J. ADAMS, R. J. BJERCKE, G. W. SLEDGE,
D. P. EDWARDS, G. C. CHAMNESS und W. L. McGUIRE (1983):
Monoclonal antibody storage conditions, and concentration
effects on immunohistochemical specificity.
J. Histochem. Cytochem. 31, 691-696

COFFINO, P., R. BAUMAL, R. LASKOV und M. SCHARFF (1972):
Cloning of mouse myeloma cells and detection of rare
variants.
J. Cell Physiol. 79, 429-440

COLE, R. J. und R. H. COX (1981):
Handbook of toxic fungal metabolites.
Academic Press, New York

CORLEY, R. A., S. P. SWANSON, G. J. GULLO, L. JOHNSON,
V. R. BEASLEY und W. B. BUCK (1986):
Disposition of T-2 toxin, a trichothecene mycotoxin, in
intravascularly dosed swine.
J. Agric. Food Chem. 34, 868-875

CROFT, W. A., B. B. JARVIS und C. S. YATAWARA (1986):
Airborne outbreak of trichothecene toxicosis.

Atmos. Environ. 20, 549-552

ELLISON, R. A. und F. N. KOTSONIS (1974):

In vitro metabolism of T-2 toxin.

Appl. Microbiol. 27, 423-424

ESGIN, S. (1987):

Erstellung und Anwendung eines enzymimmunologischen

Verfahrens zum Nachweis von T2-Toxin.

Diss. med. vet. München

FAN, T. S. L., G. S. ZHANG und F. S. CHU (1984):

An indirect enzyme-linked immunosorbent assay for T-2 toxin
in biological fluids.

J. Food Prot. 47, 964-967, 970

FANTL, V. E., D. Y. WANG und R. E. KNYBA (1982):

The production of high affinity monoclonal antibodies to
progesterone.

J. steroid Biochem. 17, 125-130

FAZEKAS De ST.GROTH, S. und D. SCHEIDEGGER (1980):

Production of monoclonal antibodies: strategy and tactics.

J. Immunol. Methods 35, 1-21

FEIT, C., A. H. BARTAL und Y. HIRSHAUT (1984):

Enhancement of hybridoma formation by addition of insulin
to HAT medium (HIAT).

Hybridoma 3, 377-380

FEUERSTEIN, G., J. A. POWELL, A. T. KNOWER und K. W. HUNTER (1985):

Monoclonal antibodies to T-2 toxin. In vitro neutralization of protein synthesis inhibition and protection of rats against lethal toxemia.

J. Clin. Invest. 76, 2134-2138

FONTELO, P. A., J. BEHELER, D. L. BUNNER und F. S. CHU (1983):

Detection of T-2 toxin by an improved radioimmunoassay. Appl. Environ. Microbiol. 45, 640-643

FRIGUET, B., A. F. CHAFOTTE, L. DJAVADI-OHANIANCE und M. E. GOLDBERG (1985):

Measurements of the true affinity constant in solution of antigen-antibody complexes by enzyme-linked immunosorbent assay.

J. Immunol. Methods 77, 305-319

GAL, H. (1987):

Versuche zur Gewinnung Antikörper-sezernierender Hybridoma-Kulturzellen mittels Elektrofusion im Vergleich zur PEG-Fusion.

Diss. med. vet. München

GALLATI, H. und I. PRACHT (1985):

Peroxidase aus Meerrettich: Kinetische Studien und Optimierung der Peroxidase-Aktivitätsbestimmung mit den Substraten H_2O_2 und 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin

J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 23, 453-460

GALFRE, G. und C. MILSTEIN (1981):

Preparation of monoclonal antibodies: strategies and procedures.

Meth. Enzymol. 73, 3-46

GALFRE, G., S. C. HOWE, C. MILSTEIN, G. W. BUTCHER und J. C. HOWARD (1977):

Antibodies to major histocompatibility antigens produced by hybrid cell lines.

Nature 266, 550-552

GAREIS, M. (1988):

Persönliche Mitteilung.

GAREIS, M., A. HASHEM, J. BAUER und B. GEDEK (1986):

Identification of glucuronide metabolites of T-2 toxin and diacetoxyscirpenol in the bile of isolated perfused rat liver.

Toxicol. Appl. Pharmacol. 84, 168-172

GEFTER, M. L., D. H. MARGULIES und M. D. SCHARFF (1977):

A simple method for polyethylene glycol-promoted hybridization of mouse myeloma cells.

Somat. Cell Genet. 3, 231-236

GENDLOFF, E. H., J. J. PESTKA, S. P. SWANSON und L. P. HART (1984):

Detection of T-2 toxin in *Fusarium sporotrichioides*-infected corn by enzyme-linked immunosorbent assay.

Appl. Environ. Microbiol. 47, 1161-1163

GENDLOFF, E. H., J. J. PESTKA, D. E. DIXON und L. P. HART (1987):

Production of a monoclonal antibody to T-2 toxin with strong cross-reactivity to T-2 metabolites.

Phytopathology 77, 57-59

GODING, J. W. (1980):

Antibody production by hybridomas.

J. Immunol. Methods 39, 285-308

DERSELBE (1986):

Monoclonal antibodies: principles and practice.

Academic Press, London

GÖRG, A., W. POSTEL und R. WESTERMEIER (1982)

SDS electrophoresis of legume seed proteins in horizontal ultrathin-layer pore gradient gels

Z. Lebensm. Unters. Forsch. 174, 282-285

GOODBRAND, I. A., W. H. STIMSON und J. E. SMITH (1987):

A monoclonal antibody to T-2 toxin.

Lett. Appl. Microbiol. 5, 97-99

GROOPMAN, J. D., L. J. TRUDEL, P. R. DONAHUE, A. MARSHAK-ROTHSTEIN und G. N. WOGAN (1984):

High-affinity monoclonal antibodies for aflatoxins and their application to solid-phase immunoassays.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 7728-7731

HABERMEHL, G. G., L. BUSAM, P. HEYDEL, D. MEBS,

C. H. TOKARNIA, J. DÖBEREINER und M. SPRAUL (1985):

Macrocyclic trichothecenes: cause of livestock poisoning by the Brazilian plant *Baccharis coridifolia*.

Toxicon 23, 731-745

HACK, R., E. MÄRTLBAUER und G. TERPLAN (1987):

A monoclonal antibody to the trichothecene T-2 toxin:

screening for the antibody by a direct enzyme immunoassay.

J. Vet. Med. B 34, 538-544

HACK, U. (1987):

Persönliche Mitteilung.

HÄRRI, E., W. LOEFFLER, H. P. SIGG, H. STÄHELIN, CH. STOLL,
CH. TAMM und D. WIESINGER (1962):

Über die Verrucarine und Roridine, eine Gruppe von
cytostatisch hochwirksamen Antibiotica aus *Myrothecium*-
Arten

Helv. Chim. Acta 45, 839-853

HOFFMANN, S. (1986):

Entwicklung empfindlicher enzymimmunologischer Testver-
fahren auf Mikrotitrationsplatten zum Nachweis von
Trenbolon und Diethylstilbestrol.

Diss. med. vet. München

HOOGENRAAD, N., T. HELMAN und J. HOOGENRAAD (1983):

The effect of pre-injection of mice with pristane on
ascites tumour formation and monoclonal antibody
production.

J. Immunol. Methods 61, 317-320

HUNTER, K. W., A. A. BRIMFIELD, M. MILLER, F. D. FINKELMAN
und S. F. CHU (1985):

Preparation and characterization of monoclonal antibodies
to the trichothecene mycotoxin T-2.

Appl. Environ. Microbiol. 49, 168-172

JARVIS, B. B., J. O. MIDIWO, J. L. FLIPPEN-ANDERSON und
E. P. MAZZOLA (1982):

Stereochemistry of the roridins.

J. Nat. Prod. 45, 440-448

JARVIS, B. B., K. M. WELLS, Y.-W. LEE, G. A. BEAN,
T. KOMMEDAHL, C. S. BARROS und S. S. BARROS (1987):

Macrocyclic trichothecene mycotoxins in Brazilian species
of *Baccharis*.

Phytopathology 77, 980-984

JONAK, Z. L. (1980):

Isolation of monoclonal antibodies from supernatant by $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ precipitation.

In: KENNETT, R. H., T. J. McKEARN und K. B. BECHTOL:

Monoclonal antibodies; p. 405-406

Plenum Press, New York

KABILKA, G. (1986):

Zum Nachweis von T-2 Toxin in Blutserum, Harn und Kot.

Diss. med. vet. München

KEARNEY, J. F., A. RADBRUCH, B. LIESEGANG und K. RAJEWSKY
(1979):

A new mouse myeloma cell line that has lost immunoglobulin expression but permits the construction of antibody-secreting hybrid cell lines.

J. Immunol. 123, 1548-1550

KLAFFER, U., E. MÄRTLBAUER und G. TERPLAN (1988):

Development of a sensitive enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of diacetoxyscirpenol.

Int. J. Food Microbiol. 6, 9-17

KNUPP, C. A., S. P. SWANSON und W. B. BUCK (1986):

In vitro metabolism of T-2 toxin by rat liver microsomes.

J. Agric. Food Chem. 34, 865-868

KNUTTON, S. und C. A. PASTERNAK (1979):

The mechanism of cell-cell fusion.

Trends Biochem. Sci. 4, 220-223

KÖHLER, G. und C. MILSTEIN (1975):

Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity.

Nature 256, 495-497

KÖHLER, G. und M. J. SHULMAN (1978):

Cellular and molecular restrictions of the lymphocyte fusion.

Curr. Top. Microbiol. Immunol. 81, 143-147

KÖHLER, G., S. C. HOWE und C. MILSTEIN (1976):

Fusion between immunoglobulin-secreting and nonsecreting myeloma cell lines.

Eur. J. Immunol. 6, 292-295

KRETH, H. W. und A. R. WILLIAMSON (1973):

The number of unique monoclonal antibodies against a simple hapten in CBA mice.

in: PEETERS, H. (1973):

Protides of the biological fluids; vol. 20, p. 189-191

Pergamon Press, Oxford

KUPCHAN, S. M., D. R. STREELMAN, B. B. JARVIS, R. G. DAILEY und A. T. SNEDEN (1977):

Isolation of potent new antileukemic trichothecenes from *Baccharis megapotamica*.

J. Org. Chem. 42, 4221-4225

LEFKOVITS, J. A. und H. WALDMANN (1979):

Limiting dilution analysis of cells in the immune system.

Cambridge University Press, Cambridge

LITTLEFIELD, J. W. (1964):

Selection of hybrids from matings of fibroblasts in vitro and their presumed recombinants.

Science 145, 709-710

LOVBORG, U. (1982):

Monoclonal antibodies: production and maintenance.

William Heinemann Medical Books, London

LOWRY, O. H., N. J. ROSEBROUGH, A. L. FARR und
R. J. RANDALL (1951):
Protein measurement with the folin phenol reagent.
J. Biol. Chem. 193, 265-275

MÄRTLBAUER, E. (1988):
Zur Entwicklung enzymimmunologischer Verfahren für den
Nachweis von Mykotoxinen (Aflatoxine, Ochratoxin A und
Trichothecene).
Diss. med. vet. München

MÄRTLBAUER, E. und G. TERPLAN (1985):
Ein hochempfindlicher heterologer enzymimmunologischer
Nachweis von Aflatoxin M₁ in Milch und Milchpulver.
Arch. Lebensmittelhyg. 36, 53-55

MÄRTLBAUER, E., M. GAREIS und G. TERPLAN (1988):
Enzyme immunoassay for the macrocyclic trichothecene
roridin A: production, properties, and use of rabbit
antibodies.
Appl. Environ. Microbiol. 54, 225-230

MATSUMOTO, H., T. ITO und Y. UENO (1978):
Toxicological approaches to the metabolites of Fusaria.
XII. Fate and distribution of T-2 toxin in mice.
Japan. J. Exp. Med. 48, 393-399

MEYER, H.H.D. und B. GÜVEN (1986):
Improvement of microtitration plate enzyme immunoassays for
steroid determination by a "second antibody technique".
J. steroid Biochem. 25, 50S

MEYER, H.H.D. und S. HOFFMANN (1987):
Development of a sensitive microtitration plate enzyme
immunoassay for the anabolic steroid trenbolone.
Food Addit. Contam. 4, 149-160

MILSTEIN, C. (1980):

Monoklonale Antikörper.

Spektrum Wiss. 1980 (12), 96-108

MUDGETT-HUNTER, M., W. ANDERSON, E. HABER und

M. N. MARGOLIES (1985):

Binding and structural diversity among high-affinity monoclonal anti-digoxin antibodies.

Molec. Immun. 22, 477-488

MUELLER, U. W., C. S. HAWES und W. R. JONES (1986):

Monoclonal antibody production by hybridoma growth in Freund's adjuvant primed mice.

J. Immunol. Methods 87, 193-196

OHTA, M., K. ISHII und Y. UENO (1977):

Metabolism of trichothecene mycotoxins.

I. Microsomal deacetylation of T-2 toxin in animal tissues.

J. Biochem. 82, 1591-1598

OHTANI, K., O. KAWAMURA, H. KAJII, J. CHIBA und Y. UENO (1985):

Development of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for T-2 toxin using monoclonal antibodies.

Proc. Jpn. Assoc. Mycotoxicol. 22, 31-32

OI, V. T., P. P. JONES, J. W. GODING, L. A. HERZENBERG und L. A. HERZENBERG (1978):

Properties of monoclonal antibodies to mouse Ig allotypes, H-2, and Ia antigens.

Curr. Top. Microbiol. Immunol. 81, 115-129

PARKS, D. R., V. M. BRYAN, V. T. OI und L. A. HERZENBERG (1979):

Antigen-specific identification and cloning of hybridomas with a fluorescence-activated cell sorter.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 1962-1966

PAULY, J. U., D. BITTER-SUERMANN und K. DOSE (1986):

Production and characterization of a monoclonal antibody to the trichothecen mycotoxin diacetoxyscirpenol.

In: Proceedings of the 2nd World Congress Foodborne Infections and Intoxications; vol. II, p. 1212

26-30 May 1986, Berlin (West)

PESTKA, J. J., S. C. LEE, H. P. LAU und F. S. CHU (1981):

Enzyme-linked immunosorbent assay for T-2 toxin.

J. Am. Oil Chem. Soc. 58, 940A-944A

PETERS, H., M. P. DIERICH und K. DOSE (1982):

Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of T-2 toxin.

Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 363, 1437-1441

SAMOILOVICH, S. R., C. B. DUGAN und A. J. L. MACARIO (1987):

Hybridoma technology: new developments of practical interest.

J. Immunol. Methods 101, 153-170

SCHULZE, M. (1985):

Prinzipien und Strategien der Immunisierung.

In: PETERS, J.H., H. BAUMGARTEN und M. SCHULZE

Monoklonale Antikörper. Herstellung und Charakterisierung, p. 15-20

Springer Verlag, Berlin

SCHIMMELPFENG, L., U. LANGENBERG und J. H. PETERS (1980):
Macrophages overcome mycoplasma infections of cells in
vitro.
Nature 285, 661-662

SHULMAN, M., C. D. WILDE und G. KÖHLER (1978):
A better cell line for making hybridomas secreting specific
antibodies.
Nature 276, 269-270

SINTOV A., M. BIALER und B. YAGEN (1986):
Pharmacokinetics of T-2 toxin and its metabolite HT-2
toxin, after intravenous administration in dogs.
Drug Metab. Dispos. 14, 250-254

SNYDER, A. P. (1986):
Qualitative, quantitative and technological aspects of
trichothecene mycotoxins.
J. Food Prot. 49, 544-569

STÄHLI C., T. STAEHELIN, V. MIGGIANO, J. SCHMIDT und
P. HÄRING (1980):
High frequencies of antigen-specific hybridomas: dependence
on immunization parameters and prediction by spleen cell
analysis.
J. Immunol. Methods 32, 297-301

STAVROU, D., C. SÜSS, T. BILZER, U. KUMMER und
N. DE TRIBOLET (1983):
Monoclonal antibodies reactive with glioma cell lines
derived from experimental brain tumors.
Eur. J. Cancer Clin. Oncol. 19, 1439-1449

SWANSON, S. P., H. D. ROOD, J. C. BEHRENS und P. E. SANDERS (1987):

Preparation and characterization of the deepoxy trichothecenes: deepoxy HT-2, deepoxy T-2 triol, deepoxy T-2 tetraol, deepoxy 15-monoacetoxyscirpenol, and deepoxy scirpentriol.

Appl. Environ. Microbiol. 53, 2821-2826

TAMM, CH. (1974):

The antibiotic complex of the verrucarins and roridins.

Fortsch. Chem. Org. Naturst. 31, 63-117

THOMPSON, W. L. und R. W. WANNEMACHER (1986):

Structure-function relationships of 12,13-epoxytrichothecene mycotoxins in cell culture: comparison to whole animal lethality.

Toxicon 24, 985-994

TONEGAWA, S. (1985);

Die Moleküle des Immunsystems.

Spektrum Wiss. 1985 (12), 116-125

UENO, Y. (1977):

Mode of action of trichothecenes.

Pure Appl. Chem. 49, 1737-1745

DERSELBE (1983):

General toxicology.

In: UENO, Y.:

Trichothecenes-chemical, biological and toxicological aspects; developments in food science; vol. 4, p. 135-146
Elsevier, Amsterdam

- UENO, Y. und K. ISHII (1985):
Chemical and biological properties of trichothecenes from
Fusarium sporotrichioides.
In: LACEY, J.:
Trichothecenes and other mycotoxins; p. 307-316
John Wiley, Chichester
- VIENKEN, J. und U. ZIMMERMANN (1982):
Electric field-induced fusion: electro-hydraulic procedure
for production of heterokaryon cells in high yield.
FEBS Lett. 137, 11-13
- WEI, R.-D. und F. S. CHU (1985):
Modification of in vitro metabolism of T-2 toxin by
esterase inhibitors.
Appl. Environ. Microbiol. 50, 115-119
- DIESELBEN (1987):
Production and characterization of a generic antibody
against group A trichothecenes.
Anal. Biochem. 160, 399-408
- YELTON, D. E., D. H. MARGULIES, B. DIAMOND und
M. D. SCHARFF (1980):
Plasmacytomas and hybridomas. Development and applications.
In: KENNETT, R. H., T. J. McKEARN und K. B. BECHTOL:
Monoclonal antibodies; p. 3-14
Plenum Press, New York
- YOSHIZAWA, T., S. P. SWANSON und C. J. MIROCHA (1980):
In vitro metabolism of T-2 toxin in rats.
Appl. Environ. Microbiol. 40, 901-906

YOSHIZAWA, T., T. SAKAMOTO und K. OKAMOTO (1984):

In vitro formation of 3'-hydroxy T-2 and 3'-hydroxy HT-2 toxins from T-2 toxin by liver homogenates from mice and monkeys.

Appl. Environ. Microbiol. 47, 130-134

YOSHIZAWA, T., T. SAKAMOTO, Y. AYANO und C. J. MIROCHA (1982):

3'-Hydroxy T-2 toxins and 3'-hydroxy HT-2 toxins: new metabolites of T-2 toxin, a trichothecene mycotoxin, in animals.

Agric. Biol. Chem. 46, 2613-2615

YOSHIZAWA, T., K. OKAMOTO, T. SAKAMOTO und K. KUWAMURA (1985):

In vivo metabolism of T-2 toxin, a trichothecene mycotoxin. On the formation of depoxidation products.

Proc. Jpn. Assoc. Mycotoxicol. 21, 9-12

ZHANG, G.-S., S. L. SCHUBRING und F. S. CHU (1986):

Improved method for production of antibodies against T-2 toxin and diacetoxyscirpenol in rabbits.

Appl. Environ. Microbiol. 51, 132-137

Abschließend danke ich Herrn Prof. Dr. G. Terplan für die Überlassung des Themas und seine großzügige Unterstützung.

Herrn Prof. Dr. Dr. D. Stavrou vom Institut für Tierpathologie der Universität München danke ich für die Möglichkeit, in seiner Abteilung die Prinzipien der Hybridomtechnologie zu erlernen.

Herrn Dr. K.-J. Zaadhof danke ich für die Sorgfalt und das Engagement bei der Durchsicht dieser Arbeit.

Besonders danke ich Frau B. Bloching für die ausgezeichnete technische Unterstützung und die gute Zusammenarbeit.

Allen Mitarbeitern des Hauses, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, möchte ich an dieser Stelle ebenfalls meinen Dank aussprechen.

Lebenslauf

Rüdiger, Elmar Hack

geboren: 7.11.1958 in Neustädtles

Eltern: Rudolf Hack und Babette Hack,
geb. Friedrich

Familienstand: verheiratet mit Dr. Ursula Hack,
geb. Federsel

Schulausbildung: 1965-1968: Katholische Volksschule in
Bad Neustadt
1969-1978: Gymnasium in Bad Neustadt
29.6.1978: Hochschulreife

Studium: 1978-1984: Studium der Tiermedizin an
der Ludwig-Maximilians-
Universität München
9.2.1984: Tierärztliche Prüfung

Approbation: 20.3.1984

Wehrdienst: 1.4.1984 - 30.6.85

Berufliche Tätigkeit: seit 1.7.85 wissenschaftliche Hilfskraft
am Lehrstuhl für Hygiene und Technologie
der Milch

